



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

A UTILIZAÇÃO TÓPICA DA INSULINA DE AÇÃO RÁPIDA NA PROMOÇÃO DO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM ANIMAIS DE
COMPANHIA

RÚBEN VENÂNCIO DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2017
LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

A UTILIZAÇÃO TÓPICA DA INSULINA DE AÇÃO RÁPIDA NA PROMOÇÃO DO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM ANIMAIS DE
COMPANHIA

RÚBEN VENÂNCIO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2017
LISBOA

“Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

Antes de mais agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as escolhas que fiz, sem as quais não estaria onde estou. Agradeço-lhes por toda a ajuda, empenho, educação e dedicação, mas acima de tudo por sempre terem estado do meu lado. Obrigado por serem ainda hoje os dois grandes pilares da minha vida!

Agradeço aos meus avós Francisco e Isabel, Luísa e Carlos o carinho que me deram e ainda dão. Agradeço-lhes por serem exemplos que seguirei para o resto da minha vida. Um obrigado por, mesmo não estando presentes fisicamente, Francisco e Isabel, terem sido a minha maior motivação ao longo desta jornada.

Agradeço ao meu primo Bruno por ser a minha companhia desde sempre e para sempre. Que as nossas vidas sejam para sempre duas retas paralelas, para que depois de convergir nunca se afastem, mas com muitos pontos de interceção.

Agradeço aos meus tios Isabel e Rui por serem uns segundos pais para mim e por contribuírem na minha educação e formação tanto quanto podiam.

Agradeço ao meu Professor Miguel Carreira por toda a amizade, disponibilidade e empenho e por tornar este trabalho num projeto a dois.

Ainda um grande obrigado ao Professor Telmo Nunes por toda a ajuda imprescindível na execução deste trabalho, recebendo-nos a todos com o sorriso e amizade a que sempre nos habituou.

Agradeço ao Hugo e ao Jorge por serem os melhores amigos que alguém pode pedir e que independentemente da distância a ausência nunca se fez sentir. Obrigado também à Nocas e à Cat por serem as melhores amigas a que se pode ter direito e por nos fazerem lembrar que apesar de qualquer coisa a presença de mulheres entre os homens é imprescindível!

Obrigado ao Vasco por toda a amizade, boa disposição e não menos importante por se disponibilizar a ler este trabalho – há que ter coragem! Não posso deixar de agradecer aos melhores jogadores de “futsaladas”, amigos sem os quais não seria quem sou hoje e que emigrados ou não nunca nada nos separe, um grande obrigado ao Branco, ao Santos, ao “Guilhas”, ao Vieira, ao “Vlad”, ao Hugo Almeida, ao “Rafa” e ao “Palhinhas”.

Agradeço à Joana e à Maria Inês por serem as minhas meninas durante estes últimos anos, sem as quais teria sido impossível chegar onde cheguei, pelo menos com a mesma felicidade, boa disposição e saúde mental, são as melhores!

Um obrigado muito muito especial ao Belo, o meu maninho, que me apoiou como ninguém durante o desenvolvimento deste projeto (efetivamente só te faltou escrever por mim). E que a nossa amizade seja como o vinho do Porto, melhor com o tempo e que depois de terminar um copo nunca falte outro.

Agradeço à Inês e à Margarida por serem as melhores doutorinhas de sempre, por todos os jantares, pelas conversas, pela motivação, pela ajuda e por todos os ensinamentos.

Agradeço à Inês Machado, à Mafalda e à Mónica a amizade, o carinho e a boa disposição durante o estágio no HEV.

Mil obrigados aos médicos e enfermeiros do HEV por toda a paciência, ensinamentos, disponibilidade e amizade durante o estágio.

Agradeço ao Cacau o amor incondicional que só ele sabe dar.

Por último agradeço ao CMVAA e ao HEV por permitirem a realização deste estudo, bem como aos donos que se mostraram disponíveis e aceitaram participar no mesmo.

A UTILIZAÇÃO TÓPICA DA INSULINA DE AÇÃO RÁPIDA NA PROMOÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM ANIMAIS DE COMPANHIA

A cicatrização é um fenómeno complexo e dinâmico que objetiva a reparação de lesões tecidulares. O presente estudo foi desenvolvido numa amostra de 29 (N=29) indivíduos, dividida em dois grupos - canídeos (N=10) e felídeos (N=19), todos do género feminino, e sujeitos a cirurgia do tipo ovariectomia (electiva ou por piometra) e teve como objetivos: 1) avaliar a acção da insulina de acção rápida no processo de cicatrização das incisões cirúrgicas, após aplicação tópica, e 2) determinar a influencia dos factores espécie, idade, peso, tipo de cirurgia, e tempo no fenómeno de cicatrização. Em cada sutura foram consideradas duas regiões de estudo: uma cranial (Zcr) que funcionou como zona de controlo, e uma caudal (Zes) que funcionou como zona de estudo, a qual recebeu topicamente duas unidades internacionais (UI) de insulina de acção rápida. Para caracterizar a evolução do processo cicatricial utilizou-se uma escala de avaliação da cicatrização de Vitor & Carreira (2015) previamente validada, considerando 2 tempos pós-cirúrgicos: T1 (2º dia) e T2 (8º dia). Não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre a cicatrização e os parâmetros: progresso de cicatrização entre espécies, idade, peso e tipo de cirurgia, contrariamente ao registado entre a cicatrização e os parâmetros: região avaliada e tempo ($P<0,05$). Foi ainda possível concluir que a cicatrização é mais lenta em felídeos do que em canídeos, e que o uso de insulina tópica nas suturas promove o aumento da velocidade do fenómeno de cicatrização nos felídeos.

Palavras-chave: *Cão; Gato; Cicatrização; Insulina; Incisão; Cirurgia.*

UTILIZATION OF TOPICAL REGULAR INSULIN ON WOUND HEALING OF SURGICAL WOUNDS IN SMALL ANIMALS

Wound healing is a complex and dynamic process that the return to normal function of tissues. A sample of twenty-nine subjects, female dogs (N=10) and female cats (=19), that went in to surgery was studied. Surgeries were elective or due to pyometra ovariohysterectomy. The aim of the present study was: 1) evaluate the action of topical administration of regular insulin in wound healing process in surgical incisions and 2) evaluate the influence of species, age, weight, surgery type and time in wound healing.

For each individual the suture was divided in two zones, a cranial control zone (Zcr) and a caudal study zone (Zes) where was applied a 2 UI of a regular insulin dressing. In order to characterize wound healing it was used a validated evaluation scale in post-surgery period from Vitor & Carreira (2015), in T1 (2nd day), and T2 (8th day). There were no statistically significant differences between wound healing and: species, age, weight, and surgery type ($p>0,05$). Contrarily, there was statistically significant differences between wound healing and: time and region ($p<0,05$). In conclusion wound healing is faster in dogs that in cats and the use of topical insulin accelerates wound healing in cats.

Keywords: *Dog; Cat; Wound healing; Insulin; Incision; Surgery.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
NOTA INTRODUTÓRIA	5
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. EMBRIOLOGIA, HISTOLOGIA E ANATOMIA DA PELE	7
1.1 A Epiderme.....	8
1.2 A Derme	9
1.3 A Hipoderme	12
2. O FENÓMENO DA CICATRIZAÇÃO.....	12
2.1 As fases da cicatrização	14
2.1.1 Fase de hemostase	14
2.1.2 Fase inflamatória	15
2.1.3 Fase proliferativa	17
2.1.3.1 A fibroplasia	18
2.1.3.2 A angiogénese	18
2.1.3.3 A reepitelização.....	20
2.1.4 Fase de remodelação	20
2.2 Tipos de cicatrização	22
2.2.1 Cicatrização por primeira intenção	22
2.2.2 Cicatrização por segunda intenção.....	22
2.3 Técnicas de abordagem cirúrgica	22
2.4 Fatores que prejudicam a cicatrização.....	23
2.5 Fatores que promovem a cicatrização	25
3. A INSULINA.....	26
3.1 Mecanismos de ação da insulina na pele	28
3.2 Relação entre insulina e cicatrização	29
PARTE III – AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE INSULINA DE AÇÃO RÁPIDA..	31
4. OBJETIVOS DO ESTUDO	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31

5.1	Amostra Utilizada	31
5.2	Protocolos.....	31
5.3	Protocolo experimental	32
5.4	Análise estatística.....	33
6.	RESULTADOS	33
7.	DISCUSSÃO	38
8.	CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		44
ANEXOS.....		50
ANEXO I – CASUÍSTICA DESCRIMINADA NOS SERVIÇOS DE MEDICINA INTERNA, CIRURGIA, IMAGIOLOGIA E MEDICINA PREVENTIVA		50
ANEXO II – FOTOGRAFIAS DAS SUTURAS EM T1 E T2.....		56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo anatómico da pele (adaptado de Seeley, Stephens, & Tate, 2003)	7
Figura 2 – Fases do processo de cicatrização (adaptado de Maynard, 2015)	14

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Escala de avaliação das suturas	33
Tabela 2 – Caracterização dos parâmetros.....	34
Tabela 3 – Teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das variáveis	34
Tabela 4 - Relação entre o processo de cicatrização e a idade e o peso, considerando a análise do total da amostra, e nas duas espécies em separado. Consideraram-se valores com significância estatística todas as relações com $p < 0,05$	37
Tabela 5 – Relação entre o processo de cicatrização e os diferentes parâmetros estudados, considerando a análise do total da amostra, e nas duas espécies em separado. Consideraram-se valores com significância estatística todas as relações com $p < 0,05$	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contabilização percentual das horas despendidas em cada serviço	1
Gráfico 2 – Contabilização percentual das espécies observadas	2
Gráfico 3 – Frequência relativa em percentagem do número de casos por especialidade	2
Gráfico 4 – Frequência relativa em percentagem do número de casos por especialidade	3
Gráfico 5 – Gráfico de Boxplot comparativo das duas espécies em função do total	35
Gráfico 6 – Evolução da cicatrização em função da Espécie e da Zona	35
Gráfico 7 – Gráfico de <i>boxplot</i> comparativo dos dois tipos de cirurgia em função do total ...	35
Gráfico 8 – Evolução da cicatrização em função do Tempo e da Zona	36

LISTA DE ABREVIATURAS

- bFGF** – Fator de crescimento básico dos fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor*)
- CEBEA** – Conselho de Ética e Bem-Estar Animal
- CINC-1** – Quimiotático neutrofílico citocina-induzido 1 (*Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1*)
- CGRP** – Péptido relacionado com o gene da calcitonina (*Calcitonin gene-related peptide*)
- CMVAA** – Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis
- Grb2** – Fator de crescimento da proteína ligante (*Growth Factor receptor-bound protein*)
- HEV - FMV** – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária
- IFN- γ** – Interferão γ
- IGF1** – Fator de crescimento da insulina 1 (*Insulin Growth Factor 1*)
- IL** – Interleucina
- IM** – Intramuscular
- IP-10** – Fator proteína interferão-induzida (*Interferon-Inducible protein*)
- IR** – Recetor da Insulina (*Insulin Receptor*)
- IRS** – Substrato do recetor da insulina (*Insulin Receptor Substrat*)
- JNK** – Cinase c-Jun N-terminal (c-Jun N-terminal kinases)
- KGF** – Fator de crescimento dos queratinócitos (*Keratinocyte growth factor*)
- MCP** – Proteína quimiotática dos monócitos (*Monocyte Chemoattractant Protein*)
- MIMV** – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
- MMP** – metaloproteinase da matriz (*Matrix Metalloproteinase*)
- OVH** – Ovariohisterectomia
- PACAP** – Péptido ativador da adenilciclase pituitária (*pituitary adenylylate cyclase-activating peptide*)
- PDGF** – Fator de crescimento derivado das plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)
- PF4** – Fator plaquetário 4 (*Platelet Factor 4*)
- PO** – via oral (*per os*)
- RTK** – Recetor da tirosina cinase (*Receptor Tyrosine Kinase*)
- SC** – subcutâneo
- TC** – Tomografia computadorizada
- TGF- β** – Factor de crescimento de transformação- β (*Transformation Growth Factor- β*)
- TIMP** – Inibidor tecidual das metaloproteinases (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*)
- TNF- α** – Factor de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor- α*)
- UI** – Unidade inetrnacional
- UIC** – Unidade de doenças infeto-contagiosas
- ULisboa** – Universidade de Lisboa

UV – Ultravioletas

VCAP – proteína vascular de adesão celular (*vascular cell adhesion protein*)

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

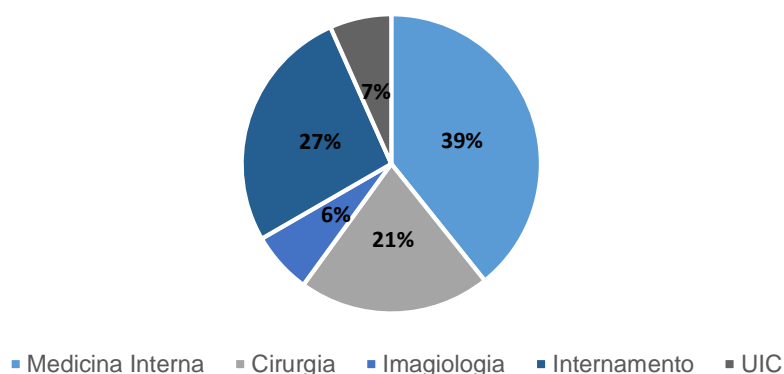
Xa – Fator X ativado

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no período compreendido entre Setembro de 2016 e Março de 2017, perfazendo um total de 1080 horas de estágio, excluindo as horas despendidas voluntariamente.

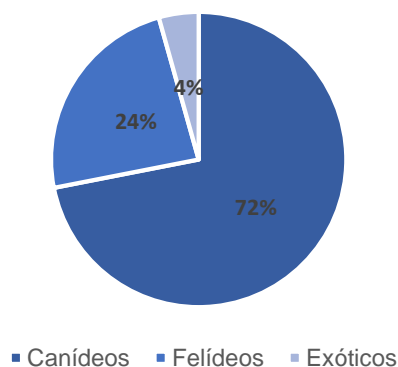
O sistema de organização das atividades baseou-se na rotatividade mensal pelos serviços de Cirurgia, Imagiologia, Internamento, Medicina Interna e Unidade de Infecção-contagiosas (UIC). No Gráfico 1 estão contabilizadas as horas em percentagem despendidas em cada serviço e a casuística descrita no Anexo I. As funções exercidas durante o estágio foram supervisionadas e acompanhadas por médicos, enfermeiros, auxiliares e/ou professores.

Gráfico 1 – Contabilização percentual das horas despendidas em cada serviço



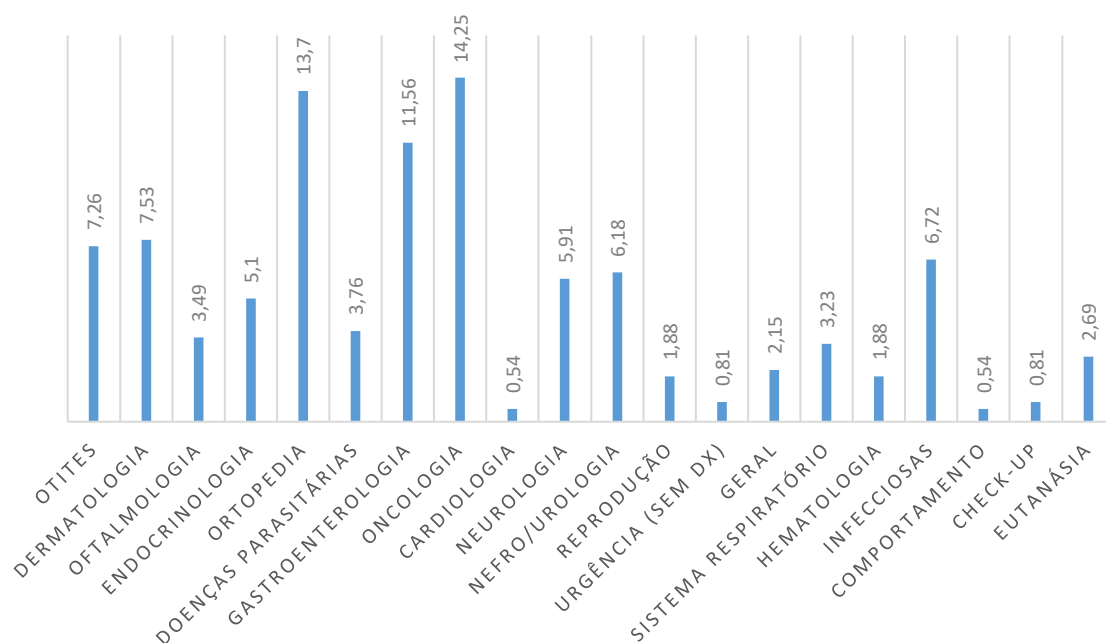
No Gráfico 2 estão contabilizadas percentualmente as espécies observadas durante o estágio curricular, nomeadamente canídeos, felídeos e exóticos. Entre os exóticos encontram-se répteis, aves e mamíferos como coelhos, ratas e furões.

Gráfico 2 – Contabilização percentual das espécies observadas



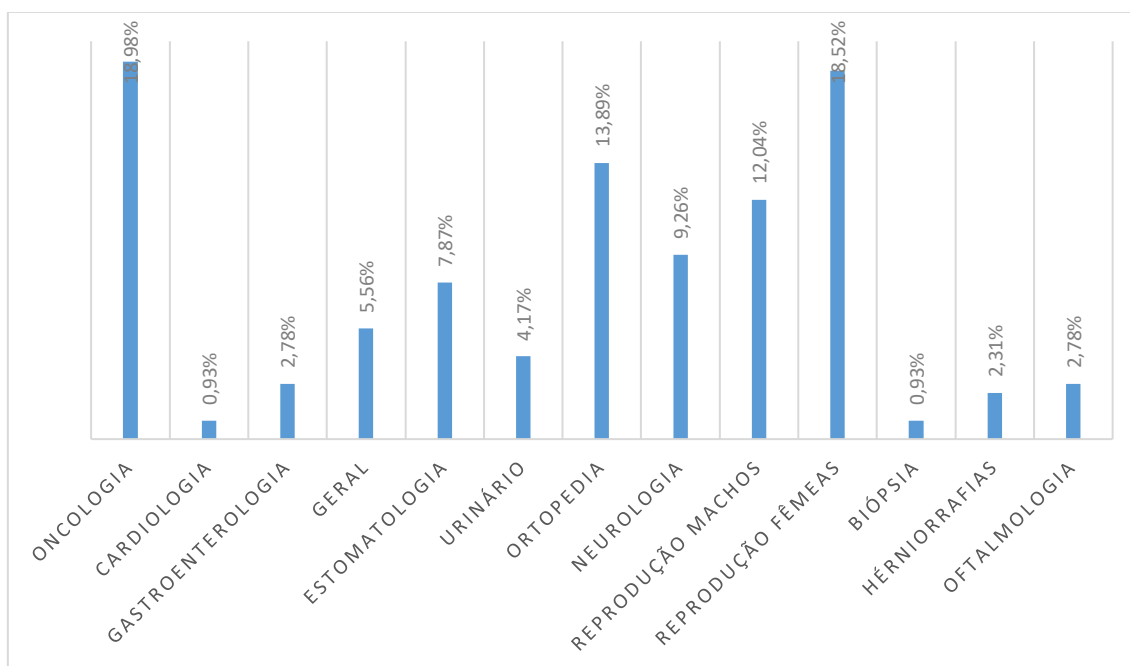
No Gráfico 3 apresenta-se a frequência relativa em percentagem do número de casos observados em medicina interna em cada especialidade.

Gráfico 3 – Frequência relativa em percentagem do número de casos por especialidade



No Gráfico 4 apresenta-se a frequência relativa em percentagem do número de casos observados em cirurgia em cada especialidade.

Gráfico 4 – Frequência relativa em percentagem do número de casos por especialidade



Em medicina interna acompanhei as consultas de medicina geral, preventiva e de especialidade, e onde tive maior contacto com donos, promovendo um desenvolvimento das minhas capacidades de comunicação, de organização e seleção de informação, assim como da aplicação de conhecimentos e conceitos teóricos adquiridos ao longo do curso. Fui responsável por dar início à consulta com a realização da história pregressa e execução do exame de estado geral, discuti os diagnósticos diferenciais com os médicos, e estabeleci planos de diagnóstico e terapêutica a implementar, em cada doente tive ainda a possibilidade de recolher e analisar amostras. Fui responsável pela execução de pensos, colocação de cateteres periféricos, contenção de animais e na administração de medicação.

No internamento assisti às passagens de turno. Neste serviço os estagiários são mais autónomos, podendo manipular mais os doentes, preparar e administrar medicação, controlar taxas de fluidoterapia, fazer monitorizações e contribuir para o bem-estar animal, assim como higienizar as boxes de internamento e acompanhar o passeio dos animais. Fui ainda responsável por apresentar e esclarecer as altas aos donos.

Em cirurgia desempenhei múltiplas atividades, desde a avaliação das análises e da condição geral dos doentes, à sua admissão, cateterização e administração de fármacos de acordo com as indicações dos cirurgiões. Auxiliei ainda na preparação dos animais para cirurgia, com a realização de intubação endotraqueal, tricotomia e assepsia. No bloco cirúrgico ajudamos na monitorização anestésica, como ajudante de cirurgião e como circulante. Fui ainda responsável pelo recobro do indivíduo e pela realização da nota de alta.

Na imagiologia fui responsável por receber, conter e posicionar os animais nos serviços de raio-X, tomografia computadorizada (TC) e ecografia. Tive ainda possibilidade de administrar

medicação anestésica e meios de contraste. No serviço de radiologia foi-me concebida a possibilidade de escolher constantes radiográficas e de executar os disparos de raio-X. Na ecografia e ecocardiografia tive a oportunidade de realizar os exames autonomamente e debater as imagens com os médicos responsáveis.

Na Unidade de infecto-contagiosas é onde os estagiários possuem maior autonomia, uma vez que nos encontramos sozinhos a maior parte do tempo. À semelhança do internamento somos responsáveis pela preparação e administração de medicação, higienização das jaulas, e monitorização dos animais.

Concluindo, o estágio no HEV da FMV proporcionou-me uma aprendizagem a vários níveis, tanto académicos como pessoais. Adquiri conhecimentos práticos e apliquei conhecimentos teóricos. Esta experiência apresentou-me uma visão profissional de diferentes formas de trabalhar, com acesso a diferentes pessoas e diferentes realidades. A casuística foi elevada, assim como a oportunidade de seguir os casos ao longo do período de estágio. Evolui em competências como o trabalho de equipa, a organização, o desenvolvimento de espírito crítico, a responsabilidade e autonomização.

A pele é um órgão complexo que depende de uma interação correta entre os diferentes tipos de células e biomoléculas sinalizadoras. As lesões a que fica exposta desencadeiam cascatas de eventos que visam a restauração da integridade estrutural e funcional. Contudo, dependendo da extensão e gravidade da ferida esta pode ser comprometida, resultando num aumento da taxa de morbilidade e mortalidade (Hrynyk & Neufeld, 2014). Surge assim a necessidade de investigar novos meios de promoção do fenómeno da cicatrização, abordando as feridas complexas com diferentes técnicas, como por exemplo a utilização de insulina como um fator de crescimento (Scimeca, Bharara, Fisher, Giovinco, & Armstrong, 2010).

No início do século XX a insulina começou a ser utilizada apenas para o controlo da Diabetes. Apenas na segunda metade do mesmo século se iniciou o seu uso como promotor da cicatrização (Liu, Petreaca, Yao, & Martins-Green, 2009), sendo que nos últimos anos a sua utilização tem sido cada vez mais extensa (essencialmente a nível experimental). A maior parte dos estudos realizados procuram avaliar o efeito promotor da insulina na cicatrização em grupos de indivíduos como os diabéticos ou doentes com feridas complexas, deixando uma lacuna sobre o efeito da insulina no processo cicatricial de feridas cirúrgicas.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a acção da insulina na promoção da cicatrização de feridas cirúrgicas quando aplicada topicamente. A via tópica apresenta vantagens relativamente às restantes, nomeadamente a facilidade de aplicação, a comodidade do indivíduo ao ser tratado bem como de quem a aplica, e a ausência de efeitos secundários (Wilson, Baines, Babu, & Kelley, 2008). A opção de utilizar como modelo de estudo apenas feridas cirúrgicas permitiu padronizar o mesmo quanto ao tipo de ferida, à sua localização, e ao local intervencionado, propiciando assim condições de cicatrização semelhantes. Além disso, a aplicação da insulina apenas na metade caudal da sutura (unidade de estudo) deixando a metade cranial da mesma (unidade de controlo) livre de qualquer tipo de tratamento, permitiu reduzir significativamente as variáveis que potencialmente interferem na avaliação do processo de cicatrização.

De forma a contextualizar o leitor no estudo, apresenta-se sucintamente uma revisão bibliográfica, que visa os seguintes temas: pele na sua estrutura, composição e funções; o fenómeno da cicatrização e os fatores promotores ou comprometedores da mesma; e a Insulina (abordando-a numa perspectiva de bioquímica fisiológica e avaliando os seus diferentes efeitos).

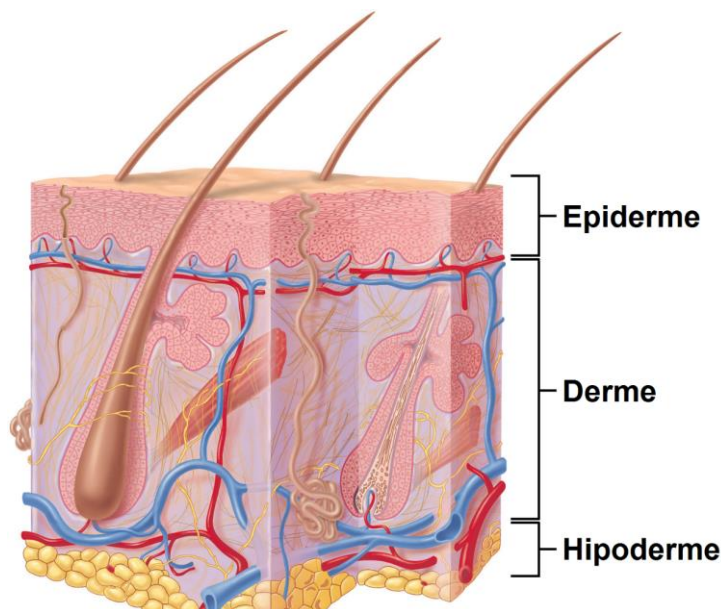
1. EMBRIOLOGIA, HISTOLOGIA E ANATOMIA DA PELE

A pele reveste completamente o corpo e une-se às mucosas nas diversas aberturas naturais (Dyce, Sack, & Wensing, 2010). É o maior órgão do corpo, atingindo 16% do peso vivo de um indivíduo (Junqueira & Carneiro, 2011).

Ainda que apenas ligeiramente mais espessa do que uma folha de papel, a epiderme, e as faneras têm muitas funções como proteger o organismo da perda de água, de infecções microbianas, de radiações, assegurando a regulação térmica, de funcionar como um meio de camuflagem, de promover as interações sociais e ainda de funcionar como um órgão sensorial capaz de captar estímulos como: prurido, dor, temperatura, pressão e toque (Blanpain & Fuchs, 2009; Hargis & Ginn, 2012).

Frequentemente a pele divide-se em duas porções: uma epitelial, de origem ectodérmica; e outra conjuntiva, de origem mesodérmica. A hipoderme, também de origem mesodérmica, encontra-se abaixo da derme sendo responsável pela união entre esta e os órgãos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 2011). A hipoderme é uma camada que gera alguma controvérsia, sendo que alguns autores a consideram como parte integrante da pele (Ichijo, Iizuka, Kubo, & Toyoshima, 2017), e outros que não a reconhecem como uma camada constituinte deste órgão (Junqueira & Carneiro, 2011).

Figura 1 – Modelo anatômico da pele (adaptado de Seeley, Stephens, & Tate, 2003)



1.1 A Epiderme

A epiderme, camada mais externa da pele, é constituída por epitélio estratificado, apresentando uma camada de células proliferativas e inúmeras outras de células diferenciadas. A formação das diferentes camadas da epiderme, isto é, estratificação, ocorre durante o desenvolvimento embrionário de forma a que na altura do parto, o indivíduo já apresente uma barreira funcional protetora do meio ambiente (Sotiropoulou & Blanpain, 2012). A formação da pele tem origem na camada de células que cobre o embrião após a fase de neurulação. Esta camada é formada por uma única fiada de células, que rapidamente se divide dando origem a uma fiada interna e outra externa. A camada externa, denominada de periderme, cobre o embrião até que a camada interna, denominada de camada basal ou estrato germinativo, se diferencie dando origem à verdadeira epiderme. A periderme é responsável pelas trocas de água, glucose e sódio que ocorrem entre o líquido amniótico e a epiderme. As células da periderme acabam por sofrer apoptose, descamando e difundindo-se no líquido amniótico à medida que as células epiteliais se diferenciam. (McGeady, Quinn, FitzPatrick, & Ryan, 2006).

Em associação ao mesênquima, a camada basal produz e organiza uma membrana basal subjacente que é rica em proteínas de matriz extracelular e em fatores de crescimento (Blanpain & Fuchs, 2009). A camada basal divide-se, dando origem à camada espinhosa, que é mais externa, designando-se o conjunto das duas camadas de Malpighi (Gilbert, 2000). Na camada basal além das células cubóides (precursoras dos queratinócitos) encontram-se os melanócitos, as células de Merkel e ainda as células de Langerhans (Hargis & Ginn, 2012). Ao dividir-se, a camada de Malpighi forma uma camada mais exterior composta por células com grânulos de proteína, a queratina, denominada de camada granulosa. As células desta última camada não se dividem, mas diferenciam-se em queratinócitos (Gilbert, 2000).

O fenómeno de estratificação tem início com a divisão perpendicular das células basais em relação à membrana basal. Esta divisão é assimétrica já que algumas células irão permanecer na camada basal como linha germinativa e outras irão diferenciar-se em queratinócitos progredindo em direção ao exterior (Lechler & Fuchs, 2005). A linha germinativa é constituída por células-tronco, as quais são responsáveis por manter a homeostasia da pele, substituindo os queratinócitos (Blanpain & Fuchs, 2009). Na camada mais externa, camada córnea, as células são achatadas e com núcleo excêntrico. A profundidade varia de 10 a 30 células consoante a zona do corpo (Gilbert, 2000). A migração dos queratinócitos da camada basal até ao estrato córneo ocorre num período de aproximadamente um mês (Hargis & Ginn, 2012).

O desenvolvimento da epiderme é estimulado por inúmeros fatores de crescimento. O fator transformador de crescimento (TGF- α) é produzido nas células da camada basal e promove a sua própria divisão; enquanto que o fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) é produzido pelos fibroblastos presentes na derme e regula a proliferação das células basais (Gilbert, 2000).

Os melanócitos derivam embriologicamente das células da crista neural, as quais são responsáveis por produzir melanina (pigmento responsável pela coloração capilar e da pele) (Hargis & Ginn, 2012). A melanina é essencial na proteção contra os raios ultra-violetas (UV) (Junqueira & Carneiro, 2011).

As células de Langerhans pertencem à linhagem do sistema mononuclear fagocitário, com origem na medula óssea e são responsáveis por processar e apresentar os antígenos aos linfócitos T, sendo por isso responsáveis pela modulação da resposta imunitária da pele (Hargis & Ginn, 2012).

A função sensorial da pele é, por seu lado, mediada por recetores específicos localizados em células que residem na epiderme, como os queratinócitos, as células de Merkel e as terminações nervosas livres (Sotiropoulou & Blanpain, 2012). As células de Merkel estão unidas ao nível da camada basal aos queratinócitos por meio de junções desmossomais. Estas células encontram-se maioritariamente em zonas da pele mais sensíveis, como os dedos e os lábios e nas zonas mais externas dos folículos capilares (Hargis & Ginn, 2012). Por outro lado, as células de Merkel são células neuroendócrinas aglomeradas em áreas sensíveis ao toque e que expressam filamentos intermediários próprios de células de epitélios simples, sugerindo que têm origem na crista neural (Sotiropoulou & Blanpain, 2012).

1.2 A Derme

A derme apresenta várias origens de acordo com a região anatómica correspondente. A derme dorsal do tórax tem origem em dermatómos dos somitos. A derme ventral e lateral do tórax e ainda a derme dos membros derivam da mesoderme lateral. Por último, uma porção da derme da cabeça e da porção anterior do pescoço derivam da crista neural (Sinowatz, 2010).

A derme tem origem num agregado de células mesenquimais, que secretam uma matriz intercelular rica em ácido hialurónico e em glicogénio, diferenciando-se em fibroblastos, os quais produzem quantidades crescentes de colagénio dos tipos I e III, e de fibras de elastina (Sinowatz, 2010). O colagénio consiste numa fita tripla helicoidal formada por três cadeias polipeptídicas. Atualmente existem aproximadamente vinte tipos de colagénio. Na matriz

extracelular cutânea o colagénio liga-se à fibronectina e à laminina. Quando se liga às células conecta-se ao nível dos recetores da integrina, sendo estas estruturas reguladas pelo fator de necrose tumoral – α (TNF- α) (Isaac, Ladeira, Rêgo, Aldunate, & Ferreira, 2010).

Quando completamente desenvolvida, a derme consiste num tecido conjuntivo fibroelástico, altamente vascularizado que pode ser subdividido em duas camadas: a reticular e a papilar (Sinowatz, 2010). Analogamente à hipoderme, também a subdivisão da derme gera alguma controvérsia. Alguns autores aceitam que esta divisão nos animais de companhia, nomeadamente cão e gato seja igual à dos humanos, isto é, divisão em camadas papilar e reticular (Sinowatz, 2010). Outros definem que a divisão é feita de forma diferente e que será mais correta a divisão em camadas superficial e profunda (Miller, Griffin, & Campbell, 2013). Também a nível da constituição estas camadas apresentam alguma diferença, sendo que a derme mais profunda apresenta maior teor de colagénio tipo I e a camada mais superficial é constituída essencialmente por colagénio tipo III (Menoita, 2015). O colagénio tipo I é constituído por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$. Este apresenta um diâmetro total de 1 a 20 μm . O colagénio tipo III é composto por três cadeias $\alpha 1$ e apresenta um diâmetro de 0,5 a 2 μm (Isaac et al., 2010).

A união entre a derme e a epiderme, é feita ao nível da camada papilar ou superficial da derme, constituída por tecido conjuntivo laxo. Nesta camada existem zonas, as papilas dérmicas, onde a união é mais forte, geralmente zonas submetidas a maiores forças de atrito e tração (Junqueira & Carneiro, 2011). Também é nesta camada que se encontram os vasos linfáticos e ainda os nervos que captam as informações provenientes do meio ambiente (Dyce et al., 2010). A camada reticular ou profunda da derme, tecido conjuntivo denso, é a mais espessa e profunda. Na derme existem ainda outras estruturas como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas, que derivam da pele (Junqueira & Carneiro, 2011).

A derme é constituída por fibras insolúveis como o colagénio e a elastina, as quais conferem resistência perante forças tensoras. Quanto às forças compressivas, elas são dissipadas por ação de macromoléculas solúveis como os proteoglicanos e o ácido hialurónico (Miller et al., 2013).

No que respeita à microcirculação da pele, ela consiste num sistema dinâmico e complexo, muito importante no metabolismo da pele, na regulação da temperatura e ainda no sistema de defesa do organismo contra microrganismos invasores (Miller et al., 2013). Os vasos sanguíneos cutâneos têm origem nos que irrigam as fáscias e os músculos superficiais. As

artérias formam redes no interior da derme (Dyce et al., 2010). As artérias dão origem a 3 plexos vasculares: profundo, médio e superficial. O plexo profundo, irriga o tecido subcutâneo e as porções profundas dos folículos e glândulas apócrinas. O plexo médio, é responsável pela irrigação das glândulas sebáceas, da porção média dos folículos e ainda dos músculos eretores dos pêlos. O plexo superficial, suprime as necessidades da porção superior dos folículos e pela nutrição e oxigenação da epiderme (Hargis & Ginn, 2012). A microcirculação capilar é formada por arteríolas, capilares arteriais e venosos e por vénulas. Os vasos mais representativos na derme superficial são as vénulas pós-capilares, que são os vasos que apresentam maior reatividade fisiológica e onde ocorre a migração de células inflamatórias do espaço vascular para os tecidos. A migração neste segmento é facilitada por fendas desenvolvidas pelas células endoteliais, de modo a promover uma maior permeabilidade vascular (Miller et al., 2013).

Os vasos linfáticos surgem da rede capilar da derme superficial, drenando para o plexo linfático subcutâneo. A rede linfática é essencial na remoção de células e de proteínas dos tecidos para a corrente sanguínea, e sendo também responsável pela regulação da ligação da pele aos linfonodos regionais. Ainda, os vasos linfáticos são responsáveis por transportar os materiais que penetrarem a epiderme e a derme, como microrganismos, solventes, medicamentos tópicos, injetáveis (vacinas ou medicamentos), e produtos resultantes da inflamação (Miller et al., 2013).

A pele possui ainda nervos somáticos sensitivos e nervos motores autónomos. Os primeiros são responsáveis por mediar sensações de toque, calor, frio, vibração, pressão, propriocepção, dor e prurido. Os nervos autónomos motores por seu lado controlam a resistência vascular ao nível da pele, as respostas capilares e a secreção das glândulas (Miller et al., 2013). A inervação da pele possui ainda outras funções, como a modelação de processos cutâneos através da regulação da inflamação, proliferação e reparação da pele. A inervação a este nível está em estrito contacto com os vasos dérmicos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos e células de Langerhans, e é regulada através da libertação de neuropéptidos pelas fibras nervosas da pele os quais vão atuar ao nível de cada célula de 3 diferentes formas: 1) induzindo os queratinócitos a libertar citocinas, como a Interleucina-1; 2) fazendo com que os mastócitos produzam citocinas pró-inflamatórias potentes como TNF- α ; 3) as células endoteliais promovem a regulação da proteína 1 vascular de adesão celular (VCAP-1) e a excreção de interleucina-8 (IL-8). Entre os neuropéptidos que regulam estas ações encontram-se: substância P; neuroquinina A, o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP); péptido intestinal vasoativo; neuropéptido Y; somatostatina; e o péptido ativador de adenilciclase pituitária (PACAP) (Miller et al., 2013).

1.3 A Hipoderme

A hipoderme é a camada sobre a qual assenta a derme, estando constituída por tecido conjuntivo laxo e une de forma pouco firme a pele aos órgãos. Dependendo das regiões e da condição corporal do indivíduo esta camada pode apresentar uma camada de tecido adiposo denominado de panículo adiposo (Junqueira & Carneiro, 2011). Noutras regiões do corpo, nomeadamente nos lábios, nas bochechas, no pavilhão auricular e no anus, não existe hipoderme (Miller et al., 2013). Além dos fibroblastos e outros tipos de células livres, o tecido subcutâneo apresenta feixes irregulares de fibras de colagénio interpostos com fibras elásticas, um número variável de adipócitos e ainda em algumas regiões do corpo, como na região torácica e cervical, fibras de tecido muscular esquelético (Sinowatz, 2010).

A hipoderme é formada na sua maioria por triglicéridos, que representam aproximadamente 90% do peso, sendo por isso uma importante fonte de reserva de energia, e também na produção de calor, como meio de isolamento e ainda nas funções de proteção e de suporte. É ainda responsável por formar os contornos do corpo, por armazenar e participar no metabolismo dos esteroides e pela produção de estrogénios (Miller et al., 2013).

2. O FENÓMENO DA CICATRIZAÇÃO

O fenómeno da cicatrização é um fenómeno tecidular que ocorre após uma lesão, e que objectiva restaurar a sua estrutura e função (Cornell, 2012), representante de um complexo processo de eventos fisiológicos e bioquímicos (Krahwinkel & Boothe, 2006), que se desenvolvem de forma distinta de acordo com o carácter agudo ou crónico das lesões.

Compreende uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos que constituem as diferentes fases (Menoita, 2015), cuja a classificação é variável de acordo com os diferentes autores. Para Ackermann (2012) e Menoita (2015) o processo de cicatrização pode diferenciar-se em 4 fases: fase de hemóstase, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (Figura 1). De acordo com Balsa & Culp (2015) e Fossum (2012) o processo de cicatrização compreende também 4 fases, mas cuja a denominação é diferente, nomeadamente a fase inflamatória, a fase de desbridamento, a fase de reparação ou proliferativa e a fase de maturação. Nesta classificação a fase de hemóstase referida pelos primeiros autores, está compreendida na fase inflamatória e a fase de desbridamento foi apresentada separadamente da fase inflamatória. Por último, em 2012, Cornell descreveu o processo de cicatrização como um evento de apenas 3 fases, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação (Cornell, 2012).

O processo de cicatrização tem início logo após a lesão dos tecidos (Fossum, 2012), sendo influenciada por um conjunto vasto de fatores externos, pelas características da própria lesão e ainda por fatores intrínsecos ao próprio organismo (Fossum, 2012). As diferentes fases da cicatrização sobrepõem-se entre si, como tal é comum que numa única lesão ou ferida (cirúrgica ou não) existam mais do que uma fase a ocorrer em simultâneo (Balsa & Culp, 2015). Esta sobreposição ocorre devido às variações na velocidade de reparação dos diferentes tecidos, no entanto a sequência cronológica das fases é, em indivíduos saudáveis e feridas não infetadas, sempre igual (Ackermann, 2012; Balsa & Culp, 2015).

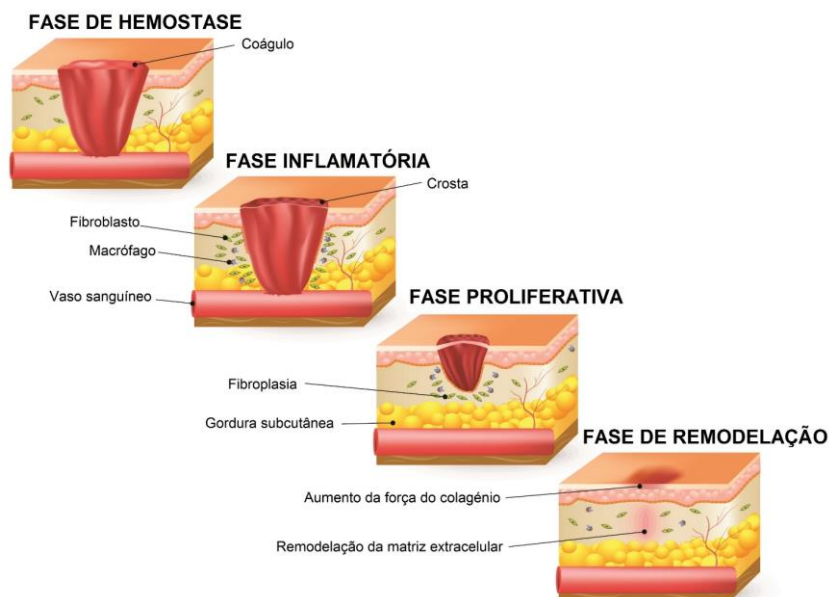
As fases descritas são aplicáveis a todos os tecidos e órgãos, contudo cada sistema possui os seus tipos de células mesenquimatosas e parenquimatosas que irão influenciar o processo de cicatrização (Ackermann, 2012).

São vários os componentes celulares que fazem parte do processo de cicatrização: plaquetas, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos e queratinócitos. Além destas existem ainda alguns mediadores celulares, como os fatores de crescimento, as citocinas e as quimiocinas (Cornell, 2012), os quais por terem uma carga elétrica positiva, são atraídos por moléculas da matriz extracelular como os proteoglicanos, que possuem cargas elétricas negativas (Ackermann, 2012).

Os fatores de crescimento são proteínas que se ligam aos recetores presentes na superfície das células, promovendo a proliferação ou diferenciação celular. Podem ser ou não específicos, isto é, podem atuar num único tipo de células ou em diferentes tipos celulares. Podem também ser autócrinos ou parácrinos. Os fatores de crescimento autócrinos, são produzidos numa determinada célula e atuam apenas ao nível da mesma ou de células do mesmo tipo, enquanto que os fatores de crescimento parácrinos são produzidos num determinado tipo de célula e atuam nos diferentes tipos de células adjacentes à mesma, desde que apresentem os recetores apropriados na sua superfície (Cornell, 2012).

Quanto às citocinas e as quimiocinas, elas são pequenas proteínas produzidas por uma grande variedade de células. As citocinas fazem parte de uma família única de proteínas que promove o crescimento, a diferenciação e a ativação de funções, regulando e determinando assim a natureza das respostas imunitárias. Estas proteínas são excretadas inicialmente por leucócitos e estimulam as imunidades celular e humoral. Por seu termo, as quimiocinas são citocinas apenas com atividade quimiotática (Cornell, 2012).

Figura 2 – Fases do processo de cicatrização (adaptado de Maynard, 2015)



2.1 As fases da cicatrização

2.1.1 Fase de hemostase

A fase de hemóstase é caracterizada por ser uma resposta de emergência, apersentando o seu início aproximadamente 20 segundos após a lesão. Pode ser subdividida em hemóstase primária e secundária. A fase de hemóstase primária ou fase vascular, compreende 4 fases distintas: vasoconstrição, adesão, ativação plaquetária e agregação plaquetária. A hemostasia secundária consiste na resposta dos fatores de coagulação à cascata da coagulação, formando uma rede de fibrina que confere maior força ao tampão plaquetário desenvolvido (Menoita, 2015).

Inicialmente a hemóstase é promovida pela presença de vasoespasmo, que consiste na vasoconstrição dos vasos sanguíneos como resposta à agressão dos tecidos (Ackermann, 2012), e que ocorre inicialmente devido à produção e libertação de adrenalina, noradrenalina e prostaglandinas como resposta à endotelina (Balsa & Culp, 2015). Contudo este vasoespasmo é transitório e após um breve período de tempo de aproximadamente 5 a 10 minutos, a hemóstase fica sob a responsabilidade das plaquetas (Balsa & Culp, 2015; Fossum, 2012). Cujo início ocorre quando estas plaquetas aderem ao endotélio vascular. Essa aderência é ativada através de uma ligação estabelecida entre a glicoproteína Ib/IX/V presente na superfície das plaquetas e o colagénio exposto aquando da lesão do endotélio. Sendo mediada pelo fator de Von Willebrand, o qual funciona como uma ponte entre a superfície das plaquetas e o colagénio. A aderência das plaquetas ao colagénio promove a

sua ativação (Menoita, 2015), e o início de segregação de substâncias vasoconstritoras de forma a manter o vasoespasmo nos vasos lesionados (Ackermann, 2012).

Com a sua ativação, as plaquetas alteram a sua forma e libertam o conteúdo dos seus grânulos para o plasma, do qual fazem parte: produtos de oxidação do ácido araquidónico pela via cicloxigenase, ADP, fator de ativação plaquetária e fatores de crescimento. Por último, promovem ainda mais a agregação plaquetária, formando o chamado trombo branco ou tampão plaquetário (Menoita, 2015).

Na fase secundária da hemóstase ocorre a ativação do sistema conhecido como, cascata da coagulação, a qual apresenta duas vias: a via intrínseca ou via da ativação de contacto e a via extrínseca ou via do fator tecidual (Menoita, 2015). Aquando da lesão as células lesadas libertam um mediador denominado de tromboplastina que irá ativar o mecanismo extrínseco da coagulação (Balsa & Culp, 2015). O coágulo formado estabiliza os bordos da ferida e confere-lhe alguma força cicatricial (Fossum, 2012). As plaquetas são as células responsáveis por iniciar o processo trombogénico, de forma a originar o coágulo que ajude a controlar a hemorragia, e também dão início ao processo de angiogénese (Ackermann, 2012).

Ambas as vias seguem um rumo comum a partir do fator X constituinte da cascata de coagulação após a sua ativação (Menoita, 2015).

Na cascata da coagulação o fator X ativado (Xa) é responsável por converter a protrombina em trombina (Menoita, 2015), a qual por sua vez vai promover a ativação plaquetária e catalisar a transformação do fibrinogénio em fibrina (Ackermann, 2012). A trombina é também responsável pela ativação do fator XIII, que por sua vez liga de forma cruzada a fibrina à fibronectina e esta ao colagénio. Por último, a trombina ativa os fatores VIII e V, bem como a proteína inibidora dos fatores mencionados (Menoita, 2015). O fibrinogénio sérico por seu lado é clivado pela trombina formando monómeros de fibrina que se polimerizam sob a ação do fator XIII. Após a polimerização, a interação dos monómeros de fibrina com as plaquetas dará origem ao tampão plaquetário que promove assim a hemóstase (Isaac et al., 2010).

2.1.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória, analogamente à de hemóstase, tem início imediatamente após a lesão (Balsa & Culp, 2015), podendo durar até 96 horas. No entanto, caso o processo de cicatrização seja comprometido por meio de infeções, traumas ou qualquer outro meio que perturbe o seu desenvolvimento, esta fase pode prolongar-se por um período maior (Ackermann, 2012). É uma fase que se caracteriza por um aumento da permeabilidade vascular, da quimiotaxia de células provenientes do espaço vascular, de libertação de citocinas e fatores de crescimento e ainda da ativação celular (Fossum, 2012).

Verifica-se que após a vasoconstrição inicial surge a vasodilatação, que se acompanha de um aumento da permeabilidade vascular dos microvasos. Esta vasodilatação ocorre como resposta à presença de leucotrienos, prostaglandinas, histamina e quininas (Cornell, 2012). Com o aumento da permeabilidade vascular o extravasamento de células da linhagem branca é facilitado, dando origem à fase inflamatória do processo de cicatrização (Menoita, 2015) com o aparecimento dos respectivos sinais: calor, rubor e turgescência (Balsa & Culp, 2015). Como resultado da inflamação a velocidade da corrente sanguínea diminui permitindo a marginação dos leucócitos, após o qual ocorre a fase de pavimentação, onde os leucócitos aderem ao endotélio. A migração ou diapedese, ocorre sob movimentações amebóides dos leucócitos através das células que formam os vasos sanguíneos, atravessando o tecido conjuntivo até que alcancem o leito da ferida, originando o que se denomina como fase de desbridamento (Balsa & Culp, 2015). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar ao local, seguidos pelos monócitos (Menoita, 2015).

O desbridamento tem início 6 – 12 horas após a lesão (Balsa & Culp, 2015). O número de neutrófilos aumenta durante os 2 a 3 primeiros dias (Fossum, 2012). De entre as citocinas presentes, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é um dos mais importantes pois participa na quimiotaxia dos neutrófilos. Além deste existem outros, nomeadamente: o fator de crescimento de transformação- β (TGF- β), as prostaglandinas, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a Interleucina-1 (IL-1), o complemento e ainda produtos bacterianos (Cornell, 2012). Os neutrófilos desempenham várias funções importantes como a destruição de bactérias através da produção de radicais livres de oxigénio e de azoto, que incluem o superóxido, o óxido nítrico e o peroxinitrito (produto de condensação dos dois produtos anteriores) (Menoita, 2015). A destruição da matriz extracelular através da libertação de enzimas proteolíticas, a fagocitose de bactérias e detritos celulares e ainda a libertação de citocinas que prolongam a fase inflamatória, são também da responsabilidade dos neutrófilos (Balsa & Culp, 2015). O poder bactericida dos neutrófilos está dependente da disponibilidade de elevadas pressões parciais de oxigénio na ferida. O lactato produzido na região lesionada, devido à hipóxia, promove a secreção de colagénio e a angiogénese (Cornell, 2012).

No que respeita aos monócitos, eles são importantes na produção de fatores de crescimento que participam na formação e remodelação de tecidos. Transformam-se em macrófagos, ao fim de 24 – 48 horas, como resposta à exposição à matriz extracelular e a substâncias como o interferão- γ (IFN- γ), aumentando a síntese proteica, o seu tamanho celular e o número de lisossomas, microtúbulos e microfilamentos. Produzem collagenases, as quais removem o tecido necrosado, bactérias e todo o tipo de material estranho (Balsa & Culp, 2015; Fossum, 2012; Menoita, 2015), sendo ainda responsáveis por recrutar células mesenquimatosas e por estimularem a angiogénese (Balsa & Culp, 2015). Além disso, modulam a produção da matriz

extracelular pelos fibroblastos, promovendo a contração da ferida através do recrutamento de miofibroblastos, e a reparação funcional e estrutural dos tecidos ao recrutarem células parenquimatosas. Por último, segregam uma variedade de agentes quimiotáticos e fatores de crescimento que promovem a estabilização do microambiente para a fase proliferativa (Ackermann, 2012; Balsa & Culp, 2015). Perante a ausência de macrófagos a força de tensão da cicatriz ficará sempre comprometida (Balsa & Culp, 2015).

A atividade dos neutrófilos e dos monócitos mostra-se assim essencial para que ocorra a cicatrização, contudo a infiltração excessiva de células inflamatórias irá prejudicar o processo (Ackermann, 2012). Por último, surgem os linfócitos que além de acelerarem o ritmo da cicatrização, promovem a qualidade da cicatrização (Fossum, 2012).

2.1.3 Fase proliferativa

A fase proliferativa ou de reparação pode ocorrer num período de 4 dias a 4 semanas, podendo este período ser alargado se as dimensões da ferida o justificar (Ackermann, 2012; Cornell, 2012). Tem por objetivo o encerramento permanente da ferida e a reposição do tecido em falta. Alguns fatores como a dimensão e localização da lesão, e a idade do indivíduo podem influenciar o tempo em que decorre esta fase (Cornell, 2012). Nesta fase ocorrem 3 processos distintos, nomeadamente: 1) a angiogénese (formação de novo endotélio), 2) a epitelização, e 3) a fibroplasia/desmoplasia (formação do estroma do tecido conjuntivo) (Balsa & Culp, 2015); e os principais componentes celulares que intervêm são os fibroblastos, as células endoteliais e as epiteliais (Balsa & Culp, 2015).

De modo a devolver a função e a estrutura normal aos tecidos, é essencial que exista retenção de elementos da matriz extracelular que providenciem estrutura à reparação e componentes celulares funcionais. A deposição inicial de colagénio e de outras moléculas chave da matriz extracelular, ocorre após a proliferação dos fibroblastos, com consequente aumento da força cicatricial da ferida (Ackermann, 2012).

Na cicatrização de tecidos revestidos por epitélio, a migração das células basais tem início muito precocemente, não necessitando de uma matriz de colagénio subjacente. Estas células progridem através dos bordos da ferida, sofrendo rapidamente hiperplasia (Ackermann, 2012). O epitélio cresce no sentido de fora para dentro a partir da margem da lesão cutânea (Dyce et al., 2010). As células basais migram, proliferam e distribuem-se numa tentativa de unir as margens da ferida, acabando mesmo algumas delas por se diferenciar, deixando assim de proliferar e migrar (Ackermann, 2012).

2.1.3.1 A fibroplasia

A fibroplasia tem origem nas células mesenquimatosas indiferenciadas presentes no tecido conjuntivo que envolve a ferida. Os fibroblastos migram ao longo dos feixes de fibrina presentes no coágulo fibrinoso, e a sua proliferação é promovida pelos macrófagos, citocinas e moléculas da matriz extracelular, como PDGF, TGF- β e fator de crescimento endotelial (VEGF). Além destes fatores o ambiente ligeiramente ácido e o teor de oxigénio na ferida também promovem a fibroplasia (Balsa & Culp, 2015).

Com a evolução do processo cicatricial a matriz extracelular, anteriormente composta essencialmente por proteínas derivadas das plaquetas e do plasma, passa por modificações na sua composição (Menoita, 2015). Em resposta ao PDGF, os fibroblastos iniciam a síntese de colagénio tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina (Cornell, 2012), a qual é ainda promovida pela ação do TGF- β sobre os fibroblastos. Este último fator é também responsável pela adesão e migração celular (Balsa & Culp, 2015).

O ácido hialurónico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de se ligar à água, é também produzido em grandes quantidades pelos fibroblastos. Esta molécula auxilia na resistência do tecido às forças de compressão, e conjuntamente com a fibronectina da matriz extracelular, promove um microambiente que permite a migração celular (Menoita, 2015).

Com a contínua modificação na composição da matriz extracelular, verifica-se uma diminuição do ácido hialurónico e aumento da síntese de proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados, assim como uma diminuição da migração e mobilidade celular, o que favorece a sua diferenciação (Menoita, 2015).

2.1.3.2 A angiogénese

A angiogénese tem como ponto de partida a vascularização pré-existente em redor da ferida, onde algumas células nela localizadas produzem o VEGF e fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF), os quais vão estimular o aparecimento de novos vasos no leito da ferida (Balsa & Culp, 2015; Cornell, 2012). Analogamente ao poder bactericida dos neutrófilos, que está dependente dos níveis de pressão parcial de oxigénio na ferida, também a resposta do endotélio capilar ao VEGF e a outros fatores de crescimento angiogénicos é oxígeno-dependente. Assim, também a pressão parcial de oxigénio arterial pode estimular a neovascularização caso se encontre diminuída ou inibi-la caso contrário. Estas citocinas angiogénicas ativam as células endoteliais, as quais iniciam a expressão do fator ativador do plasminogénio, o qual por sua vez cliva o plasminogénio sérico e a pró-colagenase em

plasmina com ação fibrinolítica, e a collagenase metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1), respetivamente (Isaac et al., 2010). De forma a permitir a migração das células endoteliais para capilares junto ao leito da ferida para que se formem neovasos, as MMP's degradam a membrana basal que rodeia os capilares (Gibson, Cullen, Legerstee, Harding, & Schultz, 2009).

De um modo geral, o aparecimento de vasos na região lesionada pode ser observado aproximadamente em cerca de 4 dias após o início da lesão. O desenvolvimento destes novos vasos irá promover a distribuição de oxigénio e nutrientes às células, aumentando assim a capacidade do desenvolvimento do tecido, denominado tecido de granulação (Cornell, 2012). Este tecido aparece normalmente ao 4º dia após o início da cicatrização, e tem a sua origem na interação entre os neovasos, os fibroblastos e o tecido fibroso, numa matriz extracelular ativa (Balsa & Culp, 2015). É de grande importância na cicatrização já que é resistente a infeções, desempenha um papel importante na contração cicatricial e providencia uma estrutura para a epitelização (Balsa & Culp, 2015).

O TGF- β é um fator de crescimento que pertence a uma superfamília de citocinas sendo secretado na sua forma inativa e ativado por inúmeras enzimas presentes na corrente sanguínea ou libertadas aquando da lesão celular, em particular: a MMP-2, a MMP-9 e a plasmina (Kwan, Hori, Ding, & Tredget, 2009). O pico de TGF- β ocorre 7 a 14 dias após o início da lesão e auxilia na transformação de matriz extracelular. Além da propriedade pró-fibrótica deste fator que aumenta a síntese de colagénio tipo I, o TGF- β é também responsável por diminuir a produção de metaloproteinases da matriz e por aumentar a produção dos seus inibidores. O fator proteína interferão-induzida (IP-10) limita, indiretamente, o recrutamento de fibroblastos e diminui a produção de interferões e do fator plaquetário (PF4). A concomitância destes fatores inibe o efeito mitogénico sobre os fibroblastos (Cornell, 2012).

A atividade proteolítica na matriz extracelular é por seu lado muito regulada durante o processo de cicatrização das feridas, existindo um controlo na ativação e inibição das enzimas. Os inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMP's) são ativados conjuntamente com as MMP's, e a sua função é regular o desempenho destas ligando-se às MMP's inativando-as. Assim, nas feridas existe um equilíbrio entre a atividade das MMP's e os TIMP's (Menoita, 2015).

Os fibroblastos presentes no leito da ferida transformam-se em miofibroblastos sob a ação do TGF- β e do PDGF (Cornell, 2012; Kwan et al., 2009). Após esta diferenciação, os miofibroblastos expressam α - actina, α -miosina e desmina (Isaac et al., 2010). Além de

promover a proliferação celular e a reorganização da actina, o PDGF impede a apoptose dos mesmos. A sinergia resultante entre o PDGF e o TGF- β resulta de um aumento do número de recetores do segundo por ação do primeiro (Kwan et al., 2009). Os miofibroblastos formam adesões locais que exercem força como uma alavanca, contribuindo para a contração da ferida (Cornell, 2012). Para que possam exercer força, os miofibroblastos alinham-se e ligam-se às fibras de colagénio de maior espessura, e assim, quanto maior o teor de fibras de colagénio de maior espessura (colagénio tipo I) maior será a contração da ferida sofrida pelos bordos ou margens (Isaac et al., 2010). A diferenciação dos miofibroblastos está associada a um aumento na expressão do isótopo de actina do músculo liso- α (Cornell, 2012).

2.1.3.3 A reepitelização

A reepitelização tem como objetivo devolver à epiderme a função e estrutura perdidas com o traumatismo sofrido (Isaac et al., 2010). Nas margens da ferida, as células epiteliais iniciam a sua proliferação e migração de forma a cobrir a lesão, minimizando a perda de fluído e a invasão bacteriana, como resposta aos fatores VEGF e TGF- α (Cornell, 2012). Ao fenómeno que ativa as células adjacentes à região da ferida, que perderam contato com as células vizinhas, denomina-se: efeito de vizinhança livre (Menoita, 2015). Inicialmente o alongamento das células basais e o aumento da espessura da epiderme ocorre nas margens da ferida. A migração continua até que ocorra inibição por contato pelas células epiteliais presentes nas regiões adjacentes. Contudo, a proliferação continua numa tentativa de devolver a espessura normal à epiderme (Cornell, 2012). A fase de reparação ou proliferação considera-se concluída quando a epiderme está restabelecida (Balsa & Culp, 2015).

2.1.4 Fase de remodelação

A fase de remodelação ou maturação tem início 7 dias a alguns meses após a lesão, e decorre apenas após as fases de inflamação e proliferação estarem completas (Ackermann, 2012; Balsa & Culp, 2015). Esta fase pode prolongar-se até 2 anos após o encerramento da ferida (Menoita, 2015). Clinicamente esta é a fase mais importante do processo de cicatrização e caracteriza-se por remodelar e aumentar a força do colagénio tecidual. Inicialmente nesta fase a matriz extracelular é fina e permitindo a migração das células para o leito da ferida. Antes do desenvolvimento de forças isométricas, isto é, uma igualdade de tensão em todas as direções, a remodelação da matriz depende da migração celular e da proteólise das proteínas matriciais (Cornell, 2012). A fase de remodelação é necessária pelo facto de as feridas inicialmente produzirem uma matriz extracelular desorganizada, na qual continuam a ser produzidos baixos níveis de MMP's. Estas substâncias removem gradualmente a matriz desorganizada, sendo esta substituída por outra mais organizada e com reestruturação das fibras de colagénio.

A matriz extracelular dérmica é constituída essencialmente por dois componentes: 1) o colagénio fibrilar (responsável por conferir força à estrutura) e 2) os glicosaminoglicanos (responsáveis pela hidratação) (Kwan et al., 2009). Com o tempo as fibras de colagénio tornam-se mais espessas e orientam-se segundo o eixo de forças de tensão do corpo, e as que não se encontrem segundo essa orientação são degradadas (Balsa & Culp, 2015).

Aproximadamente 30% do colagénio no tecido de granulação é do tipo III, contudo, com o evoluir da cicatrização este é remodelado e substituído, contribuindo com apenas 10% no tecido cicatricial final. Desta forma, o rácio colagénio tipo I: tipo III vai-se aproximando dos valores nos tecidos normais (Cornell, 2012). Na pele normal, a matriz extracelular é constituída essencialmente por colagénio do tipo I, aproximadamente 80%, sendo que o colagénio tipo III representa apenas 10 – 15%. Existe ainda algum teor de colagénio tipo V, mas em quantidades mínimas (Kwan et al., 2009). Concomitantemente à alteração do rácio, a matriz torna-se proporcionalmente mais rígida (Cornell, 2012).

A acumulação de colagénio na região lesionada resulta de um aumento do número de fibroblastos na zona, bem como do aumento da produção de colagénio por cada célula. A produção de colagénio cessa ao fim de 4 a 5 semanas, contudo a maturação pode ocorrer durante 12 a 18 meses (Balsa & Culp, 2015; Cornell, 2012).

A força da matriz extracelular é resultado da quantidade de colagénio depositada, bem como da forma como as fibras estão organizadas, sendo ainda proporcional ao número de ligações covalentes transversais. Quando secretado na forma de tropocolagénio, as ligações transversais das fibras são feitas por pontes de hidrogénio. Durante o processo de maturação as lisinas, as hidroxilisinas e as lisinas glicosiladas são oxidadas até aldeídos pela enzima lisiloxidase, e após a oxidação, a molécula liga-se a outros grupos aldeídos ou a lisinas não oxidadas por meio de ligações covalentes (Balbino, Pereira, & Curi, 2005). A força da matriz evolui de 3% da força de tensão do tecido normal na primeira semana, para 30% à terceira semana. Ao fim de 3 meses, a cicatriz apresenta a força cicatricial correspondente a aproximadamente 70 a 80% da força de tensão de um tecido normal (Balsa & Culp, 2015; Cornell, 2012; Menoita, 2015).

Nesta fase o tecido de granulação é remodelado, sendo substituído por tecido conjuntivo imaturo e este último é convertido em tecido conjuntivo maturo através da formação de colagénio extracelular. A remodelação pode ocorrer num período de 2 ou mais anos, o que define o tempo necessário para que o tecido ou órgão volte a possuir a força de tração normal (Ackermann, 2012).

2.2 Tipos de cicatrização

A cicatrização por primeira intenção na pele ocorre quando as margens ou bordos da ferida estão alinhados e unidos, devendo ser sempre a primeira escolha em feridas sob condições ideais, como é o caso das feridas cirúrgicas. A cicatrização em feridas onde a aposição dos bordos não é assegurada, diz-se cicatrização por segunda intenção, a qual está indicada em feridas infetadas, com corpos estranhos, ou com falta de tecido em que a aposição não seja possível. É importante ter em atenção que no caso de o processo de cicatrização por primeira intenção ser comprometido ou tardio, o processo passa a ser por segunda intenção (Ackermann, 2012).

2.2.1 Cicatrização por primeira intenção

Na cicatrização por primeira intenção a estabilidade conferida pelo meio de fixação escolhido é substituído ao nível da derme, por fibras de colagénio que vão maturar e conferir à ferida uma força de tração aproximadamente normal. Este processo ocorre num período que envolve algumas semanas. A epitelização ocorre por hiperplasia das células basais e o defeito fica coberto ao fim de 3 a 5 dias. A cicatrização por primeira intenção quase não deixa defeitos, com exceção de uma suave fibrose na derme superficial e a perda de anexos da pele como folículos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas na zona da ferida (Ackermann, 2012).

2.2.2 Cicatrização por segunda intenção

Na cicatrização por segunda intenção o tecido conjuntivo é sintetizado ao acaso, não existindo uma organização no processo de cicatrização. O tecido conjuntivo vai preencher o defeito na derme superficial e profunda. A desorganização dá origem a um atraso ou pode mesmo impedir a migração das células epiteliais que vão tentar cobrir a lesão, promovendo uma deposição desorganizada de matriz extracelular. Como consequência o tecido conjuntivo fibroso pode formar tecido de granulação, cuja força de tração é inferior, o que pode levar a que as feridas abram novamente. Por último, as feridas cicatrizadas por segunda intenção poderão permanecer ulceradas, e com falta de pelo. Em alguns casos o tecido conjuntivo fibroso entra numa proliferação continua que poderá fazer protrusão à superfície da pele, dando origem a uma cicatriz hiperplástica (Ackermann, 2012).

2.3 Técnicas de abordagem cirúrgica

Na cicatrização por primeira intenção pode ainda distinguir-se 3 técnicas diferentes, em 3 momentos distintos da cicatrização: 1) encerramento primário; 2) encerramento primário tardio; e 3) encerramento secundário. Designa-se por encerramento primário à técnica em

que se encerra uma ferida nas primeiras 24 horas após a lesão, e utiliza-se quando exista pouca lesão dos tecidos bem como uma contaminação mínima, sendo essencial que o tecido seja viável (Dernell, 2006).

A técnica de encerramento primário tardio, consiste no encerramento da ferida 3 a 5 dias após a lesão, e exige que ocorra antes da formação do tecido de granulação, e é utilizada quando a contaminação e lesão dos tecidos são diminutas e já ocorreu algum grau de cicatrização, bem como algumas tentativas de desbridamento. De forma a encerrar a ferida de modo seguro necessita de tecido móvel e viável para sustentar o meio de ligação implementado (Dernell, 2006).

Por fim, o encerramento secundário utiliza-se em tecidos lesados e/ou contaminados, em feridas que necessitem de desbridamentos repetidos e aplica-se apenas após o tecido de granulação estar formado (Dernell, 2006).

2.4 Fatores que prejudicam a cicatrização

Vários são os fatores com origem local ou sistêmica que prejudicam a cicatrização (Ackermann, 2012; Cornell, 2012). Em 2008, Franz et. al. publicou diretrizes para promover a cicatrização em feridas agudas, ao diminuir fatores que prejudicassem a sua cicatrização. Nestas diretrizes foram descritas 12 categorias, 6 locais e 6 sistêmicas, de fatores que podem prejudicar a cicatrização. Nos fatores locais encontram-se: 1) perfusão da ferida, 2) viabilidade dos tecidos, 3) hematoma, 4) seroma, 5) infecções e 6) outros fatores mecânicos. Dentro dos fatores sistêmicos destacam-se: 1) processos imunitários, 2) processos oncológicos, 3) diversas alterações sistêmicas, 4) lesões de ordem traumática, 5) agentes externos e ainda 6) cicatrização excessiva (Franz et al., 2008).

O aporte sanguíneo é essencial na cicatrização ao fornecer oxigênio e substratos metabólicos às células. Desta forma, uma perfusão sanguínea deficiente como consequência do próprio trauma, de isquemia devido a ligaduras ou pensos demasiado apertados, ou ainda devido à mobilidade da própria ferida, pode diminuir a velocidade de cicatrização (Fossum, 2012).

O seroma também promove um ambiente hipóxico que prejudica a cicatrização, bem como diminui a migração celular na mesma região (Fossum, 2012).

A *síndrome de Ekman-Lobstein* ou *osteogenesis imperfecta* caracteriza-se pela alteração na deposição de proteínas da matriz extracelular e de colagénio, devido a uma disfunção na produção de colagénio tipo I. Analogamente, em indivíduos com *síndrome de Ehlers-Danlos* a cicatrização pode ser comprometida por disfunção na síntese, na reticulação (*cross-linking*), na hidroxilação ou no processamento pós-translacional do colagénio. Em indivíduos com *diabetes mellitus* a hiperglicosilação das proteínas pode também alterar a vascularização

levando ao aparecimento de úlceras diabéticas, e à inibição do processo de cicatrização (Ackermann, 2012).

Alguns agentes quimioterápicos também podem inibir a proliferação celular e reduzir a capacidade de cicatrização. Alguns quimioterápicos mais recentes têm tropismo especial para as células endoteliais, o que influencia o processo de neovascularização essencial à cicatrização (Ackermann, 2012). Deste modo, a radioterapia e outras medicações, como corticoesteróides, afetam negativamente a cicatrização (Davidson, 2015). Tanto a medicação quimioterápica como a radioterapia devem ser suspensas durante duas semanas após a cirurgia (Fossum, 2012). Em espécies que necessitem de uma dieta que inclua vitamina C, como os humanos e os porquinhos-da-índia, a carência desta vitamina pode levar a que desenvolvam escorbuto, caracterizada pela diminuição na síntese de hidroxiprolina, aminoácido constituinte do colagénio, o que também irá prejudicar a cicatrização (Ackermann, 2012).

Em 2015, Davidson sugeriu outros fatores associados ao indivíduo que podem atrasar ou inibir a cicatrização, nomeadamente: má-nutrição, indivíduos geriátricos, doença hepática, hiperadrenocorticism, diabetes mellitus, urémia e obesidade (Davidson, 2015). Além destas características, indivíduos vítimas de queimaduras graves que apresentam uma deficiência dos níveis séricos de proteínas, como a albumina, vêm presente uma disfunção na reabsorção de fluídos ao nível da ferida e consequente edema devido à acumulação do mesmo. (Ackermann, 2012). Valores proteicos <1,5 a 2 g/dl tendem a diminuir a velocidade de cicatrização e a força cicatricial (Fossum, 2012).

Animais geriátricos tendem a apresentar um processo de cicatrização mais lento, provavelmente devido a doenças concomitantes ou debilidade (Fossum, 2012). A espécie do indivíduo tende também a influenciar a velocidade de cicatrização, bem como a força da mesma. Em gatos a velocidade e força cicatricial é inferior comparativamente aos cães (Fossum, 2012).

A má-nutrição, ou consumo inadequado de nutrientes também influencia a cicatrização nas feridas. (Chan & Freeman, 2006). A própria ferida possui também ela, características que podem influenciar o processo de cicatrização, é o caso da presença de material estranho que pode induzir reações inflamatórias exuberantes que comprometem uma cicatrização normal. A libertação de enzimas, com o objetivo de degradar corpos estranhos, pode destruir a matriz extracelular da ferida, prolongando a inflamação e atrasando a fase fibroblástica da fase de reparação (Fossum, 2012).

Uma infecção corresponde a uma contaminação da ferida por microrganismos na ordem das 10^5 unidades formadoras de colónias por grama de tecido ou superior (Balsa & Culp, 2015). Todas as feridas estão em risco de desenvolverem infecção e consequentemente apresentarem um atraso na cicatrização. O microrganismo mais frequentemente isolado de infecções do local cirúrgico em canídeos foi o *Staphylococcus* (Krahwinkel & Boothe, 2006; Turk, Singh, & Weese, 2015). As colonizações bacterianas encontram melhores condições de se desenvolverem em ambientes húmidos (Fossum, 2012). Em ambientes húmidos existe uma maior probabilidade de se desenvolverem foliculites e maceração dos bordos da ferida (Fossum, 2012).

2.5 Fatores que promovem a cicatrização

A cicatrização de feridas ocorre num ambiente que contém diferentes produtos bioquímicos, os quais quando balanceados corretamente promovem o processo de cicatrização. Destes produtos fazem parte: fatores quimiotáticos, eicosanóides, espécies reativas de oxigénio, células inflamatórias e enzimas, cuja interação entre eles promove o desbridamento da ferida e providência os componentes necessários à cicatrização (Krahwinkel & Boothe, 2006).

O recurso a medicamentos que atuam ao nível da cicatrização é uma prática de rotina, sendo que eles atuam de formas diferentes: mantendo o ambiente húmido, fornecendo uma fonte de energia local, reduzindo o edema da ferida através de reações hidrofílicas, aumentando os níveis de fatores de crescimento, fornecendo fontes de substâncias cicatrizantes, aumentando a resposta inflamatória, controlando a infecção, auxiliando no desbridamento, aumentando a concentração de oxigénio e aumento do fluxo vascular (Krahwinkel & Boothe, 2006).

O ambiente húmido na ferida promove uma melhoria do processo de cicatrização, impedindo a formação de crostas, e consequentemente a retenção de leucócitos, além de melhorar a penetração de medicação tópica. A taxa de epitelização ocorre ao dobro da velocidade em tecidos húmidos (Fossum, 2012).

A temperatura é também um fator que pode ser utilizado como um meio de acelerar a cicatrização, já que ao submeter a ferida a uma temperatura de 30°C a cicatrização será mais rápida e possuirá uma maior força de tensão (Fossum, 2012).

Em indivíduos com elevadas concentrações séricas de corticoesteróides, a administração de vitamina A ou de esteroides anabolizantes pode contrariar os efeitos deletérios dos primeiros. Da mesma forma, também a utilização de anti-inflamatórios não esteroides, ao impedir uma inflamação exuberante, promove uma mais rápida cicatrização (Fossum, 2012).

A utilização das vitaminas A e E e de *Aloé vera* promovem a cicatrização em feridas irradiadas (Fossum, 2012).

A exposição a campos eletromagnéticos de pico-tesla aumenta a força de feridas suturadas e acelera a contração das mesmas, enquanto que a terapia hiperbárica com oxigénio aumenta a dissolução de oxigénio no plasma e promove o crescimento de novos capilares. Esta terapia mostra-se de grande utilidade em feridas isquémicas. A ultrassonografia e a fototerapia com uso de laser de baixo poder, diminuem a fase inflamatória e aumentam a libertação de fatores que irão promover a fase proliferativa do processo de cicatrização. A utilização de pressões subatmosféricas controladas pode ajudar a remover o líquido intersticial, o que permite uma descompressão dos tecidos, removendo detritos e promovendo assim cicatrização (Fossum, 2012). O tratamento em feridas por pressão negativa tem sido utilizada como auxiliar da cicatrização, na medida em que desenvolve a formação de tecido de granulação, auxilia na contração da ferida, promove a epitelização da ferida, remove fluidos intersticiais e material infectado, quando aplicada nos limites da ferida, além de conduzir ao encerramento da ferida num ambiente húmido (Scimeca et al., 2010).

A utilização de fatores de crescimento tem sido alvo de pesquisas biomédicas, principalmente no campo da cicatrização. Os fatores de crescimento mais exaustivamente estudados são o VEGF, o TGF- β e o PDGF. Ao disponibilizar-se fatores de crescimento à ferida permitimos que o processo de cicatrização se desenvolva mais precocemente, não sendo necessário esperar pela libertação destes fatores por parte das células. Contudo, a produção de fatores de crescimento purificados é muito dispendiosa. Desta forma, a utilização destes fatores de crescimento tem sido essencialmente utilizada com fins experimentais (Hrynyk & Neufeld, 2014).

3. A INSULINA

A insulina é uma hormona produzida nas células β dos ilhéus de Langerhans no pâncreas. Esta hormona chega ao fígado pela circulação portal, sendo depois distribuída pelo restante organismo (Gilor & Graves, 2010). A insulina é estruturalmente semelhante entre os vertebrados, diferindo normalmente em apenas 1 a 3 aminoácidos entre espécies (Watkins, 1983). Nos mamíferos a sua natureza inicia-se com a forma de um péptido único denominado de pré-pro-insulina constituído por 110 aminoácidos (Greco, Broussard, & Peterson, 1995). A este péptido são removidos 25 resíduos originando a pró-insulina, a qual será convertida em insulina no aparelho de Golgi das células β do pâncreas. No final, a insulina apresenta um peso molecular de aproximadamente 5800 Da (Emdin, Dodson, Cutfield, & Cutfield, 1980).

Atualmente a insulina humana é sintetizada através de técnicas de ADN recombinante podendo ser utilizada nos animais de companhia. É formulada considerando o seu tempo de ação classificando-se como insulina de ação rápida (regular), intermédia (lenta, NPH) ou prolongada (ultralenta, PZI). De forma a retardar a sua absorção, tornando-a lenta ou ultra-lenta, é-lhe adicionada protamina nas insulinas NPH e PZI (Greco et al., 1995). No caso das insulinas de ação lenta, a sua absorção é regulada pelo tamanho dos cristais de zinco-insulina que as constituem, e à medida que os cristais aumentam de tamanho a absorção torna-se mais lenta (Greco et al., 1995).

Em cães com *diabetes mellitus* não complicada a administração de insulina deve ser ajustada de forma a simular a concentração fisiológica, o que implica que se inicie a terapêutica com doses entre 0.4 a 0.7 U/kg uma a duas vezes por dia. Em gatos a dose de insulina inicial é de 0.2 a 0.5 U/kg (Greco et al., 1995). A insulina de ação rápida foi concebida de forma a simular o bolus pós-prandial de insulina, apresentando um período de ação de aproximadamente 3 horas (Gilor & Graves, 2010).

A insulina é um importante regulador do crescimento, iniciando a sua ação através da ligação aos seus recetores, para com outras moléculas intermediárias, incluindo o substrato 1 do recetor da insulina (IRS-1), o substrato 2 do recetor da insulina (IRS-2) e a proteína Shc. (Pelegrielli et al., 2001). Durante a ativação dos recetores a insulina liga-se a um dos dois locais de ligação em cada monómero $\alpha\beta$, denominados sítios 1 e 2 (M. C. Lawrence, McKern, & Ward, 2007). Quando a insulina se liga primeiro ao sítio 1, ocorre uma reação de reticulação de alta afinidade que permite ao sítio 2 tornar-se acessível à ligação do ligando, ativando o recetor. Este regime de ligação indica que os recetores de insulina (IR) demonstram uma cooperação negativa, isto é, quando um ligando se liga ao recetor a afinidade para o segundo ligando diminui (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Os IR estão presentes na membrana plasmática das células de todos os tecidos do corpo. Este recetor pertence às proteínas transmembranares de sinalização, família dos recetores da tirosina cinase (RTK), da qual fazem parte também os recetores de VEGF, PDGF e do fator de crescimento de insulina-1 (IGF-1) (Hrynyk & Neufeld, 2014). É possível encontrar até 30×10^4 recetores de insulina por célula (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Estruturalmente, os IR são glicoproteínas sintetizadas como pro-recetores e são clivados de forma a formarem recetores heterotetraméricos com 350 a 400 kDa, compostos por duas subunidades- α com 135 kDa cada e duas subunidades- β com 95 kDa cada, unidas por ligações bissulfito numa configuração β - α - α - β (Hrynyk & Neufeld, 2014). A sub-unidade α é totalmente extracelular e protege o local de ligação da insulina. A sub-unidade β é

transmembranária e é responsável pela transmissão do sinal, possibilitando a atividade da tirosina quinase (Saltiel & Kahn, 2001).

Os recetores do IGF-1 e os IR formam híbridos funcionais que permitem compreender o facto de a insulina e do IGF-1 atuarem nos recetores um do outro (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Após a insulina se ligar aos IR, estes dimerizam e sucedem-se uma cadeia de eventos de sinalização, que se inicia com a fosforilação das tirosinas intracelulares presentes nas subunidades- β do recetor, permitindo á proteína SHC (encontrada no citosol) ligar-se através do seu domínio Src-homólogo-2 (Hrynyk & Neufeld, 2014). Várias moléculas mensageiras como é o caso do recetor do fator de crescimento da proteína ligante (Grb2), o qual vai recrutar outros mensageiros que ativam o gene Ras (Lima et al., 2012), através da qual a informação é passada para os genes Raf, MEK e ERK. O ERK transloca-se então para o núcleo induzindo o comando à célula para replicação do seu ADN e assim proliferar (Saltiel & Kahn, 2001), promovendo a reparação dos tecidos e o processo cicatricial (Hrynyk & Neufeld, 2014).

A ativação dos IR estimula assim a produção de biomoléculas necessárias à reparação dos tecidos lesados, e à absorção de glucose que é necessária para o suporte energético às células em replicação. Ainda assim, o mecanismo exato pelo qual a insulina ao nível dos recetores induz o processo de cicatrização é pouco conhecido. Contudo, é aceite que o IR desenrola um papel importante na regeneração dos tecidos e na aquisição de biomacromoléculas que auxiliam este processo (Hrynyk & Neufeld, 2014).

3.1 Mecanismos de ação da insulina na pele

A insulina é uma hormona peptídica e um fator de crescimento com diversas funções fisiológicas. A sua função primária é regular os níveis de glucose no sangue. Contudo, desde o século passado, a insulina tem sido utilizada na área da cicatrização, apresentando comparativamente a outros fatores de crescimento, a vantagem de ser pouco dispendiosa e de poder ser aplicada em pensos que irão cobrir a ferida (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Em indivíduos diabéticos, normalmente a ferida não reepiteliza, potenciando o desenvolvimento de infeções (Thalhimer, 1923). Em 1954, Lawrence et. al. estudaram os efeitos da insulina em ratas hipofisectomizadas, postulando que a insulina seria responsável pela retenção de nitrogénio na captação de aminoácidos, síntese de proteínas e inibição do catabolismo proteico (R. T. Lawrence, Salter, & Best, 1954), fatores muito importantes na reparação dos tecidos após lesão (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Na pele, os IR encontram-se nos fibroblastos e nos queratinócitos em populações distintas, de elevada e de baixa afinidade de ligação. Os fibroblastos apresentam aproximadamente 1.1×10^3 locais de ligação de elevada afinidade e 3×10^4 de baixa afinidade, por célula. Os

queratinócitos apresentam 6×10^3 locais de ligação de elevada afinidade e 8×10^4 de baixa afinidade, por célula (Hrynyk & Neufeld, 2014).

Nos queratinócitos, os IR são responsáveis por induzir a expressão de queratinas 1 e 10 durante a diferenciação induzida pelo cálcio, inibindo ao mesmo tempo a ativação do recetor de IGF-1, o qual apresenta efeitos inibitórios. A presença de recetores com diferentes níveis de afinidade permite uma resposta a diferentes concentrações de insulina no sangue (Hrynyk & Neufeld, 2014). Na pele normal, apenas algumas células da derme e da epiderme expressam a proteína IGF-1, contudo, todas as células da epiderme, macrófagos e algumas células inflamatórias expressam IGF-1 1 a 3 dias após a lesão (Werner & Grose, 2003). O facto de os queratinócitos e os fibroblastos apresentarem IR, e da insulina ter a capacidade de ativar as vias de transdução fosfatidilinositol cinase-3 e da proteína mitogénica com atividade cinase, suportam a teoria do modo de aplicação tópica de insulina no processo de cicatrização (Zhang et al., 2007).

3.2 Relação entre insulina e cicatrização

Recentemente a aplicação tópica de fatores de crescimento como promotores da cicatrização, tem sido utilizada. Os fatores de crescimento apresentam contudo baixas concentrações no leito da ferida, sendo o resultado da diminuição do seu fornecimento, do aumento nas ligações destes, ou mesmo devido à sua degradação natural. Em 2016, Duckworth et al. demonstraram que a insulina tem a capacidade para degradar os fluidos da ferida (Duckworth, Fawcett, Reddy, & Page, 2004).

O IGF-1, um polipéptido constituído por 70 aminoácidos e com uma sequência muito semelhante à insulina (Achar, Silva, Achar, Martines, & Machado, 2014), tem sido utilizado para demonstrar em estudos *in vivo* a promoção da reformulação do tecido de granulação, inibindo as vias de apoptose, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulação da proliferação, migração e excreção de matriz extracelular pelos queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (Achar et al., 2014; Ching, Sutton, Pierpont, Robson, & Payne, 2011; Scimeca et al., 2010), participando ainda na formação do tecido de granulação durante o processo de cicatrização. Contudo, indivíduos diabéticos mostram uma expressão reduzida deste fator (Achar et al., 2014). Em 2012, AboElAsrar et al. demonstraram a presença em doentes diabéticos, de uma relação entre os níveis de IGF-1 e diferentes marcadores da inflamação, nomeadamente as IL-6 e IL-8: verificando que o IGF-1 se encontra diminuído e os marcadores de inflamação aumentados (AboElAsrar, Elbarbary, Elshennawy, & Omar, 2012). O IGF-1 é um estimulador potente da mitogénese, promovendo a sobrevivência dos diferentes tipos de células, e exercendo a sua função de forma autócrina, parácrina e endócrina (Werner & Grose, 2003).

Em 1966, Paul reportou o caso de uma mulher de 56 anos de idade, que desenvolveu gangrena no pé. Após a amputação, o local desenvolveu infecção por *Staphylococcus pyogenes*. Foram administradas doses repetidas de antibióticos, nomeadamente cloxacilina e eritromicina, sem que se verificasse uma evolução positiva. Após a terapêutica com antibióticos, foi iniciada a aplicação de compressas embebidas em 20 UI de insulina, com troca a cada 12 horas, alcançando-se a cicatrização da ferida ao final de 3 a 4 dias após a aplicação tópica de insulina (Paul, 1966).

Em 1970, Belfield desenvolveu um creme contendo na sua composição 10 UI de insulina protamina de zinco por grama de base, aplicando-o em feridas cirúrgicas e não cirúrgicas, obtendo em alguns dos casos uma resposta positiva em menos de 24 horas (Belfield, Golinsky, & Compton, 1970).

Em 2008, Wilson et al. verificaram que a aplicação tópica de insulina com o objetivo de promover a cicatrização não apresentava efeitos sistêmicos (Wilson et al., 2008).

Em 2010, Jeschke demonstrou que a aplicação tópica de insulina melhorava o estado clínico de indivíduos pediátricos com queimaduras em pelo menos 30% da superfície corporal total. As melhorias associam-se a: redução de infecções e do quadro de sépsis, redução da fase inflamatória do processo de cicatrização; promoção das funções renal e hepática; e diminuição a taxa de mortalidade de 11% em indivíduos não tratados com insulina para 4% nos que tiveram acesso ao tratamento (M. G. Jeschke et al., 2010). Em 2011, Jeschke reportou que queimaduras graves poderiam levar ao desenvolvimento de apoptose hepática, a stress do retículo endoplasmático e ativação da via da proteína JNK (Cinase c-Jun N-terminal), promovendo disfunções metabólicas. Contudo, foi sugerido que a insulina poderia atenuar estes efeitos, já que 24 a 48 horas após a administração de insulina os animais apresentaram um menor stress do retículo endoplasmático ao nível do fígado, reverteram as alterações estruturais e funcionais das mitocôndrias hepáticas, e apresentaram atenuação da expressão de interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática dos monócitos (MCP-1) e o quimiotático neutrofílico citocina-induzido (CINC-1) diminuindo assim o nível de inflamação (M. Jeschke & Kraft, 2011). Em 2014, Hrynyk & Neufeld concluíram que a aplicação da insulina em feridas que se encontram nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização tiveram melhores resultados do que em fases mais avançadas do processo (Hrynyk & Neufeld, 2014).

4. OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente estudo desenvolvido no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA) e no HEV-FMV, nas espécies *Felis catus* e *Canis familiaris*, teve como objetivos:

- 1) Avaliar a ação da insulina de acção rápida no processo de cicatrização das incisões cirúrgicas, após aplicação tópica, e
- 2) Determinar a influencia dos factores espécie, idade, peso, tipo de cirurgia, e tempo de ocorrencia no fenómeno de cicatrização tecidular

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra Utilizada

O estudo foi desenvolvido numa amostra de 29 (N=29) indivíduos, dividida em dois grupos de acordo com a espécie em estudo - canídeos (N=10) e felídeos (N=19), todos do género feminino, e sujeitos a cirurgia do tipo ovariectomia (electiva ou por piometra).

Para caracterizar a evolução do processo cicatricial referente às 29 suturas estudadas – Unidades de Estudo (UE), utilizou-se uma adaptação da escala de avaliação da cicatrização no período pós-operatório de Vitor & Carreira (2015) previamente validada, considerando 2 tempos pós-cirúrgicos diferentes: T1 (2º dia), e T2 (8º dia) (ANEXO II).

Cada uma das suturas foi dividida em duas regiões de estudo: uma cranial (Zcr) que funcionou como zona de controlo, e uma caudal (Zest) que funcionou como zona de estudo, a qual recebeu topicamente duas unidades internacionais (UI) de insulina de acção rápida, uma vez por dia, ao longo de um período de 8 dias.

O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética e Bem-estar animal (CEBEA) da FMV-ULisboa, e a participação dos animais no estudo apenas se iniciou após a assinatura do termo de consentimento informado por parte dos donos.

5.2 Protocolos

Todos os doentes realizaram o mesmo protocolo medicamentoso no período pré-anestésico; incluindo: amoxicilina + ácido clavulânico (10 mg/kg; SC; Synulox®), buprenorfina (0,02

mg/kg; IM Bupaq®). Nos gatos administrou-se igualmente ácido tolfenâmico (4 mg/kg; SC; Tolfedine®) e nos cães carprofeno (4 mg/kg; SC Rimadyl®).

Em ambulatório foi prescrito o mesmo protocolo médico, formado por amoxicilina + ácido clavulânico (10 mg/kg; PO q12h; Clavamox®) durante 8 dias, ácido tolfenâmico (4 mg/kg; PO q24h; Tolfedine®) nos gatos e carprofeno (4 mg/kg; PO q24h; Rimadyl®) nos cães, durante 4 dias, e complexo vitamínico (1cp; PO q24h; Becozyme C®) durante 15 dias.

Para indução anestésica nos felídeos utilizou-se quetamina (5-7,5 mg/kg; IM; Imalgene®) em associação com dexmedetomidina (40 µg/kg; IM; Dexdomitor®), sendo a manutenção da anestesia regulada com isoflurano. A reversão do efeito da dexmedetomidina foi realizada logo após o término da cirurgia, utilizando para tal atipamezol (0,1 mg/kg; IM; Antisedan®). Nos canídeos a indução anestésica foi conseguida com o uso de propofol (4-6 mg/kg; EV; Propofol®) e a anestesia mantida com isoflurano.

5.3 Protocolo experimental

No momento da saída para ambulatório dos doentes, foi distribuído a cada um dos cuidadores, um *kit* composto por 10 compressas (5 cm x 5 cm), uma seringa de 2 ml e uma solução de insulina de ação rápida (Actrapid®), numa concentração de 2 UI/ml de solução de NaCl a 0.9%. Foi explicado aos cuidadores o modo de conservação e de aplicação da solução de insulina na Zes da sutura, solicitando-lhes ainda que efectuassem o registo fotográfico da sutura em T1 e T2. A solução seria aplicada topicamente apenas na Zes através do uso de uma compressa embebida na solução de insulina dispensada, a cada 24 horas e durante um período de 10 minutos, por 8 dias consecutivos.

A avaliação da sutura foi realizada através de uma pontuação atribuída às características das mesmas, registadas nas fotografias obtidas em T1 e T2. Para tal, utilizou-se a escala evolução de cicatrização pós-cirúrgica elaborada por Vítor & Carreira (2015) a qual foi adaptada utilizando apenas os seguintes parâmetros: 1) coloração da pele; 2) hematoma; 3) tipo de líquido regional; e 4) tipo de reação ao fio de sutura. Os 4 parâmetros foram pontuados numa escala ordinal, e o valor final em cada tempo é o resultado da soma de todos os parâmetros avaliados. A escala considera que para cada parâmetro é selecionado um valor tanto maior quanto maior o grau de lesão/ alteração do tecido apresentada (Tabela 1).

Tabela 1 – Escala de avaliação das suturas

Parâmetro	Valores possíveis	Tempos de avaliação
Coloração da pele	0 – 4	T1 – T2
Hematoma	0 – 1	T1 – T2
Tipo de líquido regional	0 – 4	T1 – T2
Tipo de reação ao fio de sutura	0 - 2	T1 – T2
Valor total	0 - 11	T1 – T2

5.4 Análise estatística

Para o tratamento de dados foi utilizado o programa Excel do Microsoft Office 2016 de forma a organizá-los. Os dados foram analisados no programa R®, versão 3.4.0, com a extensão *R commander* (Rcmdr), através de testes de medidas repetidas ANOVA. Foram considerados valores estatisticamente significativos, valores de $P < 0,05$. Para as variáveis qualitativas nominais (espécie, tipo de cirurgia) apresentou-se a sua frequência relativa. Para as variáveis qualitativas ordinais (coloração, hematoma, tipo de líquido regional, reação ao fio de sutura e total) utilizou-se a média dos valores e caracterizou-se a distribuição das mesmas. As medidas de dispersão consideraram a média e desvio padrão em caso de distribuição normal, e a mediana e intervalo interquartil no caso de distribuição não normal.

A seleção dos testes de medidas repetidas ANOVA foi baseada no facto de que existia um fator comum para as variáveis independentes tempo e região, nomeadamente o indivíduo. Desta forma a diferença individual deixa de ser um fator a considerar, permitindo aferir os resultados obtidos de forma semelhante a testes de medidas independentes. A utilização de testes não paramétricos prendeu-se com o facto de as variáveis qualitativas ordinais não apresentarem uma distribuição normal. Para aferir a normalidade das mesmas utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, sendo que para uma distribuição normal o valor de $P > 0.05$.

6. RESULTADOS

A amostra total (N=29) utilizada no estudo, está caracterizada quanto à espécie, idade, peso vivo e ao tipo de cirurgia sujeita na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização dos parâmetros

Parâmetros		N	Freq (%)	Mediana ± intervalo interquartil
Espécie	Canídeos	10	34,5	-
	Felídeos	19	65,5	-
Idade (Anos)	Canídeos	10	-	5 ± 5,1
	Felídeos	19	-	2,1 ± 5,4
Peso vivo (Kg)	Canídeos	10	-	11,5 ± 8,5
	Felídeos	19	-	4,1 ± 0,89
Tipo de cirurgia	OVH (Eletiva)	Canídeos	6	23,1
		Felídeos	16	52,8
	OVH (Piómetra)	Canídeos	4	13,8
		Felídeos	3	10,3

Número da amostra (N); Frequência (Freq)

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado nos parâmetros das suturas, analisados com a escala de cicatrização utilizada no estudo foi possível verificar que a coloração, o hematoma, o tipo de líquido na região e a reação ao fio de sutura, permitindo concluir que nenhum deles apresentou uma distribuição normal ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 3 – Teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das variáveis

Parâmetros		P- value
Características da sutura	Coloração	$6,2 \times 10^{-14}$
	Hematoma	$2,2 \times 10^{-16}$
	Tipo de líquido regional	$7,5 \times 10^{-15}$
	Reação ao fio de sutura	$2,2 \times 10^{-16}$

A pontuação final da escala utilizada quanto ao fenómeno de cicatrização da sutura apresentou uma evolução mais lenta nos felídeos conseguindo um valor de 1 ± 2 , do que nos canídeos que apresentaram um valor total final de 0 ± 2 (Gráfico 5). Contudo a cicatrização média das duas espécies respondeu de forma semelhante nas diferenças registadas nas regiões - Zcr e Zes, como é possível verificar no Gráfico 6.

Gráfico 5 – Gráfico de Boxplot comparativo das duas espécies em função do total

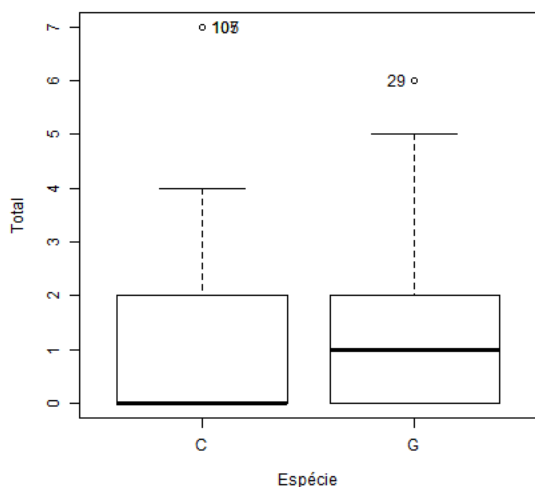
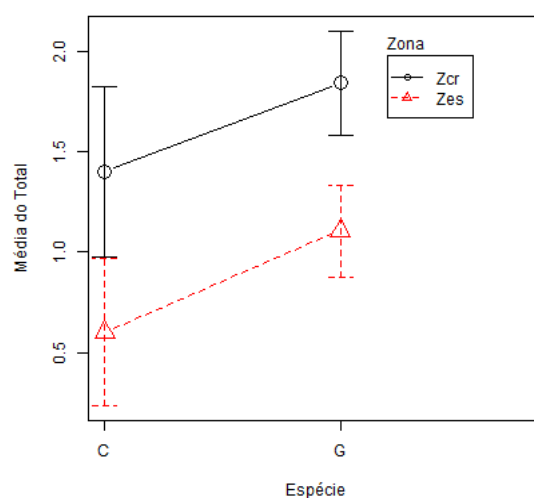
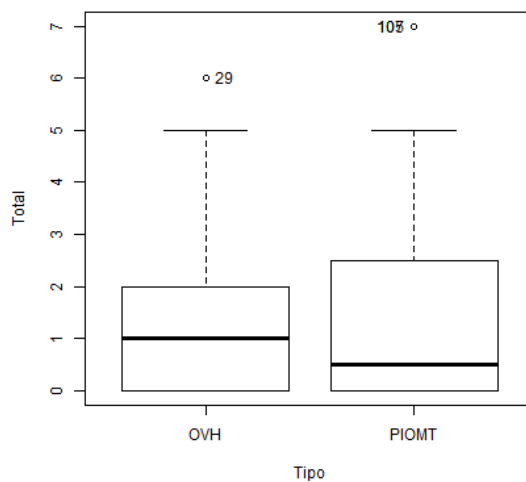


Gráfico 6 – Evolução da cicatrização em função da Espécie e da Zona



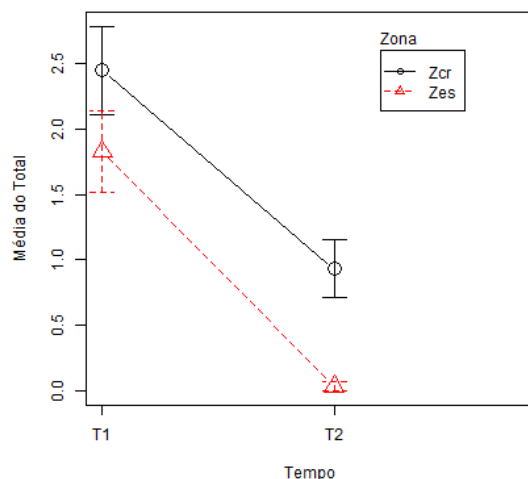
De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que o fenómeno de cicatrização foi semelhante para o tipo de cirurgia realizado, considerando os valores totais obtidos após a avaliação das suturas, 1 ± 2 nas eletivas e $0,5 \pm 2,25$ nas piómetras (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Gráfico de *Boxplot* comparativo dos dois tipos de cirurgia em função do total



A avaliação da evolução do processo de cicatrização das suturas foi realizada considerando dois tempos pós-operatórios diferentes (T1 e T2), tendo sido possível verificar que a região Zes apresentou uma pontuação mais baixa do que a região Zcr, utilizando a escala de cicatrização que variou entre 0 e 11 (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Evolução da cicatrização em função do Tempo e da Zona



Utilizando o teste de ANOVA de medidas repetidas foi possível verificar que para o total da amostra não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre o processo de cicatrização e a espécie ($P=0,72$), o tipo de cirurgia realizado ($P=0,06$), a idade ($P=0,06$) e o peso ($P>0,94$). Contrariamente, registaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o processo de cicatrização e o período de tempo em que a cicatrização ocorre ($P<0,01$), e a região da sutura ($P=0,04$) (Tabelas 4 e 5).

Contudo, quando analisadas as espécies em separado, foi possível verificar algumas variações nos resultados para alguns parâmetros avaliados. Assim, nos canídeos não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre o processo cicatricial e a idade ($P=0,37$), nem com cada uma das regiões consideradas na sutura ($P=0,34$). Nos felídeos não se registaram diferenças estatisticamente significativas apenas entre o processo de cicatrização e o tipo de cirurgia realizado (OVH electiva ou por piometra) ($P=0,28$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Relação entre o processo de cicatrização e a idade e o peso, considerando a análise do total da amostra, e nas duas espécies em separado. Consideraram-se valores com significância estatística todas as relações com $p < 0,05$

Parâmetros analisados		<i>p-value</i> ^a
Amostra total (N=29)	Idade	0,06
	Peso	0,94
Canídeos (N=10)	Idade	0,37
	Peso	0,22
Felídeos (N=19)	Idade	0,04
	Peso	0,07

a) Valores obtidos por testes de Correlação de Kendall

Tabela 5 – Relação entre o processo de cicatrização e os diferentes parâmetros estudados, considerando a análise do total da amostra, e nas duas espécies em separado. Consideraram-se valores com significância estatística todas as relações com $p < 0,05$

Parâmetros analisados		Mediana ± intervalo interquartil	<i>p-value</i> ^a
Amostra total (N=29)	Espécie	-	0,72
	Tempo	T1 = 2 ± 2	<0,01*
		T2 = 0 ± 1	
	Região	Zcr = 1 ± 2,75	0,04*
		Zes = 0 ± 1,75	
	Tipo de cirurgia	-	0,06
Canídeos (N=10)	Tempo	T1 = 0,5 ± 2	0,03*
		T2 = 0 ± 0	
	Região	-	0,34
	Tipo de cirurgia	PIOMT = 0 ± 2,5 OVH = 0 ± 1	<0,01*
Felídeos (N=19)	Tempo	T1 = 2 ± 2	<0,01*
		T2 = 0 ± 1	
	Região	Zcr = 2 ± 2	<0,01*
		Zes = 0,5 ± 2	
	Tipo de cirurgia	-	0,28

* valores estatisticamente significativos;

a) Valores obtidos por testes de medidas repetidas

7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos o tratamento de feridas evoluiu significativamente de forma a dar resposta à necessidade de cicatrização de feridas agudas e crónicas, tendo como objetivo final o encerramento completo da lesão e a recuperação da função tecidual (Sarabahi, 2012). A instituição de medidas profiláticas ao aparecimento de feridas é o que se deseja, porém, uma vez instalada deverá o clínico intervir o mais precocemente possível evitando ou minimizando os riscos recorrentes, facilitando assim o processo de cicatrização (Ferreira, Guirro, Silva, & Polacow, 2016).

A aplicação tópica de insulina tem vindo a demonstrar uma forte capacidade em promover a cicatrização mostrando-se assim uma terapia promissora (Sridharan & Sivaramakrishnan, 2017). Com foco nesta premissa, o presente estudo foi elaborado de forma a avaliar a ação da insulina administrada topicamente na promoção do processo de cicatrização em feridas cirúrgicas.

No presente estudo foi utilizada a “Escala para Avaliação do Processo de Cicatrização de Ferida Cirúrgica” elaborada e validada por Vítor & Carreira (2015), permitindo realizar uma avaliação objetiva dos resultados obtidos (Vítor & Carreira, 2015). Ainda assim, existem outros meios de avaliação da cicatrização disponíveis, nomeadamente os utilizados por Bohling et al. (2004): imagem com laser-doppler de perfusão (LDPI); planímetro; observação direta das feridas e ainda um tensiómetro (Bohling, Henderson, Swaim, Kincaid, & Wright, 2004). Em 2017, Dwivedi et al. utilizaram entre outros parâmetros, os teores de hidroxiprolina e hexosamina, constituintes do colagénio no tecido cicatricial recolhido de ratas (Dwivedi, Dwivedi, Malviya, & Singh, 2017). Ainda de forma a avaliar a evolução da cicatrização Chen et al. (2012) recorreram à observação histológica como parâmetro de avaliação, além de meios de imunohistoquímica e de tecnologia de imunofluorescência de forma a monitorizar o efeito da insulina sobre os macrófagos na cicatrização (Chen, Liu, & Zhang, 2012). Por último, Azevedo et al. (2015) deram uso a técnicas de ELISA, análise por imunoblot e coloração de Weigert de modo a comparar o tipo de cicatrização que ocorre entre ratas diabéticas com lesões por queimadura, sujeitas ou não à administração de insulina tópica (Flávia Azevedo, Carvalho, Saad, Lima, & Da Silva Cunha Breder, 2015).

O presente estudo utilizou uma insulina neutra ou regular, isto é, de ação rápida, semelhante à abordagem descrita e utilizada nos estudos mais recentes (F. Azevedo et al., 2016; Chen, Zhang, & Liu, 2012; Lima et al., 2012). Contudo, alguns autores utilizaram insulina protamina de zinco, ou seja, insulina de ação lenta, como meio de tratamento (Belfield et al., 1970; Zhang et al., 2007).

O desenho protocolado para o presente estudo garantiu que todos os indivíduos receberam um tratamento diário de 2 UI de insulina de ação rápida. A quantidade de insulina a aplicar numa lesão é ainda dos pontos mais inconsistentes nos desenhos experimentais dos diferentes autores. Em 1970, Belfield fez uso de concentrações de 10 a 80 UI, sendo que o período entre aplicações variava de 12 horas a 4 dias (Belfield et al., 1970). Por outro lado, Paul (1966) instituiu uma terapêutica de 20 UI a cada 12 horas (Paul, 1966). Já em 2012, Chen et al. utilizaram concentrações de 1,5 UI por mililitro de soro NaCl a 0,9%, aplicando o tratamento de 24 em 24 horas (Chen, Zhang, et al., 2012). Por fim, em 2016, F. Azevedo et al. fizeram uso de doses de 0,5 UI por cada 100g de peso corporal (F. Azevedo et al., 2016).

O modo de aplicação da insulina também não é um fator concordante entre os autores estudados, não parecendo, contudo, existir diferenças justificativas nos resultados dos diferentes trabalhos. Para a aplicação de insulina optou-se por recorrer a uma compressa embebida na solução de insulina, a qual estaria em contacto com a lesão durante um período de 10 minutos, analogamente ao realizado por Paul (1966). Em 2012, Chen et al. aplicaram diretamente a solução de insulina sobre a lesão, sendo que permitiram um período de absorção de aproximadamente 5 minutos (Chen, Zhang, et al., 2012). Uma terceira forma de aplicação foi desenvolvida em 1970 por Belfield, que utilizou um creme com insulina, de forma a ser aplicado diretamente na lesão, também Lima et al. (2012) e F. Azevedo (2016) fizeram uso da mesma técnica (F. Azevedo et al., 2016; Belfield et al., 1970).

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar uma diferença no processo cicatricial entre as zonas Zes e Zcr às 48 horas, o que seria de esperar uma vez que a terapêutica teve início em T0. De acordo com Azevedo et al. a administração de insulina tópica vai promover a infiltração precoce de macrófagos na área da lesão acelerando assim o desbridamento regional (F. Azevedo et al., 2015). Também Chen et al. (2012) demonstraram que após a administração tópica de insulina numa lesão, a infiltração de macrófagos ao segundo dia é equivalente à infiltração das mesmas células ao terceiro se não houver aplicação da terapêutica. A insulina possui ainda a capacidade de aumentar os níveis de MCP-1 ao nível do leito da ferida. Esta proteína tem a função de recrutar mais monócitos e ativar os macrófagos (Chen, Liu, et al., 2012), justificando assim a diferente evolução retratada entre as duas zonas avaliadas nos primeiros dias da cicatrização.

A evolução da cicatrização, avaliada 8 dias após a cirurgia, mostrou uma evolução significativa em ambas as regiões em estudo, o que seria prever dado que a fase proliferativa do processo de cicatrização tem início sensivelmente ao quarto dia, pelo que a reepitelização da lesão já se encontra em desenvolvimento (Ackermann, 2012; Cornell, 2012). Contudo, foi possível

apresentar uma diferença entre ambas as zonas em T2. Em 2016, Reis realizou um estudo em ratazanas, que permitiu demonstrar que animais, tratados ou não com insulina tópica, apresentaram uma evolução cicatricial com um padrão evolutivo semelhante. Ainda assim nas ratazanas às quais foi administrada insulina, existiu uma modulação da fase inflamatória, onde há a diminuição do número de macrófagos ao quinto dia, garantindo o fim precoce da cicatrização, o que está de acordo com os resultados do presente estudo, assim como dos estudos de Chen et al. (2012) e Reis (2016). Por outro lado, Belfield et al. (1970) aferiu que a aplicação tópica de insulina em feridas cirúrgicas não mostrou promover ou acelerar a cicatrização; ao contrário do verificado em feridas infetadas, nas quais a insulina poderia apresentar-se como uma mais valia na promoção da cicatrização (Belfield et al., 1970). Em 2000, Wicke et al. demonstraram a importância do IGF-1 na cicatrização, pelo que 90% das feridas privadas de IGF-1, apresentam perturbações um distúrbio na cicatrização, na replicação celular, na deposição de colagénio e ainda na concentração de macrófagos na ferida. Concluiu ainda que o IGF-1 apresenta ações diretas sobre fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. Considerando isto, a ação tópica da insulina na lesão será sempre assegurada pela relação que esta apresenta com os recetores do IGF-1, os quais se relacionam com o aumento de atividade celular que interfere na cicatrização (Hrynyk & Neufeld, 2014).

A utilização de duas espécies distintas no estudo *Felis catus* e *Canis familiaris*, permitiu uma abordagem mais alargada à utilização e ação da insulina no fenómeno da cicatrização. De acordo com os dados obtidos, foi possível notar a presença de uma diferença na evolução do processo cicatricial entre as duas espécies estudadas, o que está de acordo com o estudo de Bohling & Henderson (2006), que concluía que existem dissemelhanças no processo cicatricial entre os diferentes mamíferos (Bohling & Henderson, 2006). Os gatos apresentam uma cicatrização mais lenta, com menos formação de tecido de granulação, com uma menor perfusão sanguínea da ferida, uma contração cicatricial mais fraca e com menor força cicatricial ao sétimo dia, independentemente da cicatrização ocorrer por primeira ou segunda intenção (Bohling et al., 2004). A maioria do conhecimento atual sobre a cicatrização em pequenos animais é baseada na cicatrização de cães, ou então extrapolada da cicatrização de suínos, roedores ou humanos (Bohling et al., 2004).

A evolução temporal das cicatrizes entre as duas espécies mostrou resultados semelhantes, o que está de acordo com o estudo de Bohling & Henderson (2006), sendo justificado pelo facto de ambas partilharem as mesmas fases do processo de cicatrização, bem como as células e as citocinas nelas envolvidas.

Perante os valores obtidos para a idade não se encontra uma diferença estatisticamente significativa entre esta e o fenómeno da cicatrização, como seria de esperar. Não indo ao encontro dos resultados obtidos por Jones & Millman (1990), segundo os quais seria expectável uma disparidade de valores entre os sujeitos mais jovens, quando comparando com a evolução do processo cicatricial em indivíduos geriátricos (Gerstein, Phillips, Rogers, & Gilchrest, 1993; Jones & Millman, 1990). No caso dos canídeos a ausência de diferença estatisticamente significativa entre a idade e o fenómeno da cicatrização ($p > 0,05$), foi ainda mais pronunciada, podendo esta dever-se ao facto de a amostra de canídeos ser menor que a de felídeos, bem como pela maior variabilidade intra espécie nos canídeos. Desta forma, dada a diferença inter e intra espécie presente nos animais, é razoável aceitar que em felídeos ou canídeos de menor porte o fator idade seja proporcionalmente menos importante para o processo de cicatrização, que em canídeos de maior porte existindo alguma disparidade na esperança média de vida entre estes e os felídeos, 12 e 23 anos, respetivamente (Kurtus, 2011).

De acordo com Guo & DiPietro (2010) indivíduos geriátricos apresentam uma cicatrização mais lenta, podendo vir a desenvolver maior risco de disfunções no processo de cicatrização. Pelo que de forma a avaliar a influência da idade no fenómeno da cicatrização seria necessário recorrer a uma amostra mais ampla, optando por incluir apenas uma raça na amostra, no caso dos canídeos.

Analogamente, ao parâmetro idade não houve diferenças estatisticamente significativas entre o peso e o fenómeno da cicatrização. De facto, segundo Davidson (2015) a condição corporal influencia efetivamente a forma e a velocidade com que o processo cicatricial se desenrola, pelo que alguns estudos indicam que a má-nutrição, bem como a obesidade tendem a comprometer o processo de cicatrização (Chan & Freeman, 2006; Davidson, 2015). Desta forma, a ausência de diferenças estatisticamente significativas é plausível, considerando as diferenças de tamanho inter e intra espécies. Ainda de encontro a esta observação o facto de os felídeos apresentarem uma menor variabilidade de pesos intra espécie justifica o valor de P mais próximo da significância estatística. Assim, de forma a avaliar a influência do peso ou da condição corporal no processo cicatricial teria de ser utilizada uma amostra padronizada, por exemplo através da seleção de uma única raça na amostra, ou no caso dos felídeos, dada a menor variabilidade, aumentar o número de indivíduos no estudo.

O tipo de cirurgia realizada, a técnica aplicada e as condições sob as quais a cirurgia decorre tendem a influenciar o fenómeno da cicatrização de diferentes formas. Um dos fatores que deve ser ponderado é a dor pos-cirúrgica, de acordo com McGuire et al. este fator

desempenha um papel particularmente relevante sobre o fenómeno da cicatrização (McGuire et al., 2006). Desta forma, têm vindo a ser adoptadas técnicas cirúrgicas mais minimalistas, que visam aumentar o conforto do doente no período pos-cirúrgico, reduzindo a dor consequente do procedimento cirúrgico e ainda permitindo o desenvolvimento de uma cicatriz de menores dimensões (“Cirurgia minimamente Invasiva,” 2015). Desta forma, ao analisar os dois diferentes tipos de cirurgia abordados no presente estudo seria de esperar que existissem diferenças estatisticamente significativas entre ambas. Para esta diferença contribuiria ainda o facto de que no caso das OVH devido a priómetras aumentaria o risco de infeção, o que iria ser um factor prejudicial a ter em conta na cicatrização. De facto, o valor obtido para a relação entre o tipo de cirurgia e o processo cicatricial não mostrou ser estatisticamente significativo, ainda assim o valor, por se apresentar no limite mínimo estipulado, permite inferir que pode existir uma influência tendencial do tipo de cirurgia sobre a cicatrização. No caso dos canídeos o tipo de cirurgia realizada mostrou influenciar efetivamente a cicatrização, como seria de esperar, provavelmente por apresentar uma representação mais equilibrada entre ambos os tipos de cirurgia em estudo.

Desta forma, poderá vir a comprovar-se a relação entre o tipo de cirurgia e o fenómeno da cicatrização recorrendo a uma amostra de estudo de maiores dimensões.

8. CONCLUSÕES

O uso tópico da insulina nas feridas, como um promotor do fenómeno da cicatrização é ainda um assunto pouco conhecido pela maioria dos clínicos médicos e cirúrgicos, em ambas as Medicinas - Humana e Veterinária.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que a aplicação tópica de insulina potencia a cicatrização de feridas cirúrgicas no cão e no gato, diminuindo o tempo necessário para a sua conclusão. Tal facto, é de grande relevância no contexto de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas, agudas e crónicas, já que a utilização desta hormona no contexto da cicatrização tecidular potencialmente ajudará a uma recuperação mais célere dos doentes no período perioperatorio.

De acordo com o conhecimento do autor este é o primeiro estudo realizado sobre as vantagens da utilização de insulina tópica na cicatrização de feridas cirúrgicas de cão e gato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AboElAsrar, M. A., Elbarbary, N. S., Elshennawy, D. E., & Omar, A. M. (2012). Insulin-like growth factor-1 cytokines cross-talk in type 1 diabetes mellitus: Relationship to microvascular complications and bone mineral density. *Cytokine*, 59(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.019>
- Achar, R. A. N., Silva, T. C., Achar, E., Martines, R. B., & Machado, J. L. M. (2014). Use of insulin-like growth factor in the healing of open wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, 29(2), 125–31. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502014000200009>
- Ackermann, M. R. (2012). Inflammation and healing. In J. F. Zachary & M. D. McGavin (Eds.), *Patologic basis of veterinary disease* (5th ed, pp. 135–146). Missouri: Elsevier.
- Azevedo, F., Carvalho, C., Saad, M., Lima, M., & Da Silva Cunha Breder, J. (2015). Insulin topical modulates inflammatory phase and the angiogenesis of the burns wound healing in diabetic-induced rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 7(Suppl 1), A259. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-7-S1-A259>
- Azevedo, F., Pessoa, A., Moreira, G., Santos, M. Dos, Liberti, E., Araujo, E., ... Lima, M. H. (2016). Effect of Topical Insulin on Second-Degree Burns in Diabetic Rats. *Biological Research For Nursing*, 18(2), 181–192. <https://doi.org/10.1177/1099800415592175>
- Balbino, C. A., Pereira, L. M., & Curi, R. (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão, 41.
- Balsa, I. M., & Culp, W. T. N. (2015). Wound Care. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(5), 1049–1065. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009>
- Belfield, W. O., Golinsky, S., & Compton, M. D. (1970). Open_wound_healing.pdf. *Vet Med Small Anim Clin*.
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(3), 207–17. <https://doi.org/10.1038/nrm2636>
- Bohling, M. W., & Henderson, R. A. (2006). Differences in Cutaneous Wound Healing Between Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(4), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.02.001>
- Bohling, M. W., Henderson, R. A., Swaim, S. F., Kincaid, S. A., & Wright, J. C. (2004).

- Cutaneous wound healing in the cat: A macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Veterinary Surgery*, 33(6), 579–587. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2004.04081.x>
- Chan, D. L., & Freeman, L. M. (2006). Nutrition in Critical Illness, 36, 1225–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.009>
- Chen, X., Liu, Y., & Zhang, X. (2012). Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 20(3), 425–34. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00792.x>
- Chen, X., Zhang, X., & Liu, Y. (2012). Effect of Topical Insulin Application on Wound Neutrophil Function. *Wounds - A Compendium of Clinical Research and Practice*.
- Ching, Y.-H., Sutton, T. L., Pierpont, Y. N., Robson, M. C., & Payne, W. G. (2011). The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. *Eplasty*, 11, 429–449.
- Cirurgia minimamente Invasiva. (2015). Retrieved June 22, 2017, from <https://www.neurocirurgia.com/content/cirurgia-minimamente-invasiva-0>
- Cornell, K. (2012). Wound healing. In K. M. Tobias & S. A. Johnston (Eds.), *Veterinary surgery small animal* (pp. 125–134). Missouri: Elsevier Saunders.
- Davidson, J. R. (2015). Current Concepts in Wound Management and Wound Healing Products. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 45(3), 537–564. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.01.009>
- Dernell, W. S. (2006). Initial Wound Management. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(4), 713–738. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.04.003>
- Duckworth, W. C., Fawcett, J., Reddy, S., & Page, J. C. (2004). Insulin-Degrading Activity in Wound Fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(2), 847–851. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031371>
- Dwivedi, D., Dwivedi, M., Malviya, S., & Singh, V. (2017). Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of Pongamia pinnata in wistar rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.12.002>
- Dyce, K., Sack, W., & Wensing, C. (2010). *Textbook of veterinary anatomy* (4th ed). Missouri: Elsevier.

- Emdin, S. O., Dodson, G. G., Cutfield, J. M., & Cutfield, S. M. (1980). Role of zinc in insulin biosynthesis. *Diabetologia*, 19, 174–182. <https://doi.org/10.1007/BF00275265>
- Ferreira, R., Guirro, E. C. de O., Silva, C. A. da, & Polacow, M. L. O. (2016). Efeito da estimulação elétrica de alta voltagem e insulina tópica em lesão cutânea experimental. *Fisioterapia E Pesquisa*, 23(4), 352–357. <https://doi.org/10.1590/1809-2950/15311923042016>
- Fossum, T. W. (2012). *Small Animal Surgery* (4th ed.). Elsevier.
- Franz, M. G., Robson, M. C., Steed, D. L., Barbul, A., Brem, H., Cooper, D. M., ... Wiersema-Bryant, L. (2008). Guidelines to aid healing of acute wounds by decreasing impediments of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(6), 723–748. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00427.x>
- Gerstein, A., Phillips, T., Rogers, G., & Gilchrest, B. (1993). Wound healing and aging. *Dermatol Clin.*
- Gibson, D., Cullen, B., Legerstee, R., Harding, K., & Schultz, G. (2009). MMPs: made easy, 1(1), 1–6.
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. (A. D. Sinauer, Ed.) (6th ed.). Sunderland.
- Gilor, C., & Graves, T. K. (2010). Synthetic Insulin Analogs and Their Use in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(2), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.11.001>
- Greco, D. S., Broussard, J. D., & Peterson, M. E. (1995). Insulin Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 25(3), 677–689. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(95\)50062-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(95)50062-2)
- Hargis, A. M., & Ginn, P. E. (2012). The Integument. In M. McGavin & J. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease* (5th ed, pp. 972–981). Missouri: Elsevier.
- Hrynyk, M., & Neufeld, R. J. (2014). Insulin and wound healing. *Burns*, 40(8), 1433–1446. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.03.020>
- Ichijo, R., Iizuka, Y., Kubo, H., & Toyoshima, F. (2017). Essential roles of Tbx3 in embryonic skin development during epidermal stratification. *Genes to Cells*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/gtc.12476>
- Isaac, C., Ladeira, P. R. S., Rêgo, F. M. P., Aldunate, J. C. B., & Ferreira, M. C. (2010). Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina*, 89(3/4), 125.

<https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p125-131>

- Jeschke, M. G., Kulp, G. A., Kraft, R., Finnerty, C. C., Mlcak, R., Lee, J. O., & Herndon, D. N. (2010). Intensive insulin therapy in severely burned pediatric patients: A Prospective randomized trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(3), 351–359. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0190OC>
- Jeschke, M., & Kraft, R. (2011). Insulin Protects against Hepatic Damage Postburn. *Molecular Medicine*, 17(5–6), 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00166>
- Jones, P., & Millman, A. (1990). Wound healing and the aged patient. *Nurs Clin North Am*.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2011). *Histologia básica* (11 ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Krahwinkel, D. J., & Boothe, H. W. (2006). Topical and Systemic Medications for Wounds. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(4), 739–757. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.04.001>
- Kurtus, R. (2011). Comparison of Animal Ages. Retrieved June 22, 2017, from http://www.school-for-champions.com/animalhealth/animal_ages.htm#.WVJM9emQzIU
- Kwan, P., Hori, K., Ding, J., & Tredget, E. E. (2009). Scar and Contracture: Biological Principles. *Hand Clinics*, 25(4), 511–528. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2009.06.007>
- Lawrence, M. C., McKern, N. M., & Ward, C. W. (2007). Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(6), 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.07.007>
- Lawrence, R. T., Salter, J. M., & Best, C. H. (1954). The effect of insulin on nitrogen retention in the hypophysectomized rat. *British Medical Journal*, 2(4885), 437–439. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4885.437>
- Lechler, T., & Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, 437(7056), 275–80. <https://doi.org/10.1038/nature03922>
- Lima, M. H. M., Caricilli, A. M., de Abreu, L. L., Araújo, E. P., Pelegrinelli, F. F., Thirone, A. C. P., ... Saad, M. J. A. (2012). Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *PLoS ONE*, 7(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036974>
- Liu, Y., Petreaca, M., Yao, M., & Martins-Green, M. (2009). Cell and molecular mechanisms

of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-1>

Maynard, J. (2015). How Wounds Heal: The 4 Main Phases of Wound Healing. Retrieved June 23, 2017, from <http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>

McGeady, T., Quinn, P., FitzPatrick, E., & Ryan, M. (2006). *Veterinary Embryology*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

McGuire, L., Heffner, K., Glaser, R., Needleman, B., Malarkey, W., Dickinson, S., ... Kiecolt-Glaser, J. K. (2006). Pain and wound healing in surgical patients. *Annals of Behavioral Medicine*, 31(2), 165–172. https://doi.org/10.1207/s15324796abm3102_8

Menoita, E. (2015). Cicatrização das feridas complexas. In E. C. Menoita (Ed.), *Gestão de feridas complexas* (pp. 53–63). Loures: Lusodidacta.

Miller, W. H., Griffin, C. E., & Campbell, K. L. (2013). Structure and Function of the Skin. In *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (7th ed., pp. 1–57). Missouri: Elsevier Mosby.

Paul, T. N. (1966). Treatment by Local Application of Insulin of an Infected Wound in a Diabetic. *The Lancet*, (September 10), 574–576. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(66\)93041-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(66)93041-8)

Pelegrinelli, F. F. F., Thirone, A. C. P., Gasparetti, A. L., Araujo, E. P., Velloso, L. A., & Saad, M. J. A. (2001). Early steps of insulin action in the skin of intact rats. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), 971–976. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202X.2001.01473.x>

Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>

Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*.

Scimeca, C. L., Bharara, M., Fisher, T. K., Giovinco, N., & Armstrong, D. G. (2010). Novel Use of Doxycycline in Continuous-Instillation Negative Pressure Wound Therapy as “Wound Chemotherapy.” *Foot & Ankle Specialist*, 3(4), 190–193. <https://doi.org/10.1177/1938640010371121>

Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2003). Sistema tégumentar. In *Anatomia & Fisiologia* (6 ed., p. 150). Loures: Lusociência.

Sinowatz, F. (2010). The integumentary system. In *Essentials of Domestic Animals Embryology* (1st ed., pp. 317–329). SAUNDERS Elsevier.

- Sotiropoulou, P. A., & Blanpain, C. (2012). Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1–9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008383>
- Sridharan, K., & Sivaramakrishnan, G. (2017). Efficacy of topical insulin in wound healing: A preliminary systematic review and meta analysis of randomized controlled trials. *Arthritis & Rheumatism*, 2–7. <https://doi.org/10.1002/art.34459>
- Thalhimer, W. (1923). Insulin treatment of postoperative (nondiabetic) acidosis. *J Am Med Assoc*, 81, 383–5. <https://doi.org/10.1001/jama.1923.02650050037013>
- Turk, R., Singh, A., & Weese, J. S. (2015). Prospective Surgical Site Infection Surveillance in Dogs. *Veterinary Surgery*, 44(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2014.12267.x>
- Vítor, M. R. D. C. (2015). *Proposta de uma escala para avaliação do processo de cicatrização de ferida cirúrgica no cão e no gato*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa. Orientador: Carreira, L. M. A.
- Watkins, P. (1983). Choice of insulin. *Bmj*, 287(6405), 1572–1573. Retrieved from <http://www.bmj.com/content/287/6405/1572.abstract>
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>
- Wilson, J. M., Baines, R., Babu, E. D., & Kelley, C. J. (2008). A role for topical insulin in the management problematic surgical wounds. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 90(2), 160. <https://doi.org/10.1308/003588408X261816>
- Zhang, X. jun, Wu, X., Wolf, S. E., Hawkins, H. K., Chinkes, D. L., & Wolfe, R. R. (2007). Local Insulin-Zinc Injection Accelerates Skin Donor Site Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 142(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.10.034>

ANEXOS

ANEXO I – CASUÍSTICA DESCRIMINADA NOS SERVIÇOS DE MEDICINA INTERNA, CIRURGIA, IMAGIOLOGIA E MEDICINA PREVENTIVA

Pat. Médica				
		Exóticos	Felídeos	Canídeos
Otites	Parasitárias (Ácaros)			2
	CE			1
	Tinha			1
	Mista			3
	Ruptura de tímpano		1	
	<i>Malassezia pachydermatis</i>		1	5
	<i>Perfuração Tímpano</i>			1
	<i>Otohematoma</i>			2
	<i>Outras sem DX etiológico</i>			6
	<i>Bacteriana</i>		1	3
Dermatologia	<i>Atopia</i>			6
	<i>Piodermatite</i>			8
	<i>Hiperqueratose</i>			2
	<i>Hot-Spot</i>			1
	<i>Úlcera</i>			1
	<i>Seborreia</i>	1 - P. Índia		1
	<i>Acne felino</i>		1	
	<i>Pênfigos</i>			2
	<i>Outras sem DX etiológico</i>		1	4
Oftalmologia	<i>Neoplasia retrobulbar</i>		1	
	<i>Efema</i>			1
	<i>Atrofia senil da íris</i>			1
	<i>Esclerose avançada cristalino</i>			1
	<i>Luxação posterior do cristalino</i>			1
	<i>Uveíte</i>		1	
	<i>Conjuntivite</i>		2	1
	<i>Conjuntivite herpética</i>		1	
	<i>Nódulo palpebral</i>			1
	<i>Úlcera da córnea</i>		1	1
Endocrinologia	<i>Diabetes Mellitus</i>		2	7
	<i>Diabetes Insipidus</i>			1
	Hipertireoidismo		3	
	S. Addison			2
	S. Cushing			4
Ortopedia	Luxação Medial da Patela			5

	RLCA			3
	Varus	1 - Agapornis		
	Luxação Lateral da Patela			2
	Lesão coluna (Lombar)			1
	Tarso inverso		1	
	Displasia do cotovelo			5
	Doença degenerativa tibiotársica			1
	Osteomielite		1	1
	Claudicação MA		1	2
	Trauma	2 - Coelho/ 1-Pombo	2	8
	Claudicação MP	1 - Faisão		3
	Displasia da anca			10
Doenças Parasitárias	Leishmaniose			12
	Dirofilariose			1
	D. de Lyme			1
Gastroenterologia	Sialocelo			1
	Pancreatite aguda		2	6
	Fecaloma			2
	CE Linear		2	3
	CE			4
	Triadite		1	1
	Alergia alimentar			1
	Polipo rectal			10
	Prolapso rectal			2
	Outras sem DX etiológico		3	5
Oncologia	Mastocitoma			4
	Hemangiosarcoma			3
	Osteosarcoma		2	1
	Fibrosarcoma		1	
	Carcinoma da mama		1	3
	Carcinoma espinocelular		2	3
	Carcinoma hepático			1
	Carcinoma das células de transição			5
	Linfoma		5	3
	Nódulo (Sem Dx)		5	12
	Meningioma			1
	Adenoma das hepatóides			1
Cardiologia	Sopro (Sem Dx)			2
Neurologia	Def. Proprioceptivo			3
	Hérnia discal			5

	Discoespondilite			2
	Radiculite		1	
	Dor cervical			4
	Síndrome Vestibular	1 - Coelho		
	Convulsão	1 - Coelho		
	Epilepsia			5
Nefro/Urologia	Incontinência			1
	Cistite idiopática felina		1	
	DRC		6	1
	Urolitíase/Obstrução	1 - Coelho	7	3
	Infecção		1	2
Reprodução	Piômetra			1
	Hemangiosarcoma (Pênis)			1
	Fibroadenomatose		1	
	Quisto ovárico	1 - Ratazana		
	Fractura Peniana			1
	Prostatite			1
	Edema vulvar			1
Urgência (Sem Dx)		1 - Ring Neck	1	2
Geral	Ingestão de processionária			2
	Fístulas perianais			1
	Cons. Nutrição	1 - Tartaruga/ 1 - Coelho/ 2 - P. Índia		
	Cortar penas	1 - Agapornis		
Sistema Respiratório	CE			1
	Colapso traqueal			1
	Neoplasia nasal			2
	Epistáxis			1
	Derrame Pleural		3	
	Edema pulmonar		1	1
	Asma		1	
	Piotórax			1
Hematologia	Hemólise intra e extra vascular			2
	Hemoparasitas		1	3
	Anemia não regenerativa (Sem Dx)			1
Infecciosas	Coriza		2	
	Parvovirose			5
	Panleucopénia		1	
	Tosse do canil			2

	Esgana			1
	Calicivirus		4	
	Leptospirose			3
	FiV/FelV		7	
Comportamento	Agressividade			2
Check-up				3
Eutanásia			3	7

Pat. Cirúrgica				
		Exóticos	Felídeos	Canídeos
Oncologia	Mastocitoma			9
	Lobectomia hepática			1
	Carcinoma espinocelular		1	
	Hemangiosarcoma			5
	Nodulesctomia			9
	Mastectomia		4	10
	Fibrosarcoma			1
	Carcinoma espinocelular			
	Lipoma			1
Cardiologia	PDA			2
Gastroenterologia	Torção gástrica			4
	CE			1
	CE Linear		1	
Geral	Enterectomia (Fecaloma)			1
	Corte das almofadas plantares			2
	Ablação conducto auditivo			1
	Esofagostomia		5	
	Peritonite			1
	CE			1
	Trauma (Dentada)			1
Estomatologia	Destartarização/Extração		8	6
	Odontoplastia	1 - Coelho/ 1 - Chinchila		
	Biópsia		1	
Urinário	SUB		1	
	Ureterotomia		1	1
	Cistotomia (Cálculos)	1 - Coelho	2	3
Ortopedia	TTA			7
	Trauma			3
	Luxação Medial da Patela			6
	Luxação Lateral da Patela			4
	Remoção de Placas/parafusos		1	1

	Artrodese Carpo-Metacárpica			2
	Osteotomia da Ulna			1
	Over the top			1
	ARCF		1	3
	Amputação		2	4
Neurologia	Ventral Slot			5
	Distração-fusão			2
	Hemilaminectomia			13
Reprodução machos	Orquiectomia Electiva		9	2
	Orq. Ectópicos		1	1
	Órgãos com alterações			13
Reprodução fêmeas	OVH Electiva	2 - Coelho	14	12
	Piometra		2	2
	OVH + Cesariana		1	3
	Cesariana			4
Biópsia			1	1
Hérniorrafias	Paracostais			2
	Perianais			1
	Hiato			1
	Inguinais			1
Oftalmologia	Cherry eye			1
	Flushing dos ductos lacrimais			2
	Nódulo Palpebral			1
	Entrópion			1
	Prótese Intraocular			1

Med. Preventiva				
		Exóticos	Gatos	Cães
Vacinação	DHPPi			14
	RCPCh		9	
	RCP		8	
	Puppy DP	2 - Furão		1
	Leishgard			1
	Lepto Mais			2
	Canileish			4
	L4			13
	Rabisin			5
	Pi			4
	Myxo+RHD	5 - Coelho		
Desparasitação	Milbemax cachorro		2	
	Milbemax		1	4

	Heartgard			2
	Procox			2
	Drontal Plus			4
	Vectra			2
	Panacur	5 - Coelho		
Microchip				3

Ex. Complementares			
	Exóticos	Gatos	Cães
Tomografia Computorizada			7
Raio-X Intra-oral		7	8
Raio-X		3	18
Endoscopia			7
Mielografia			3
Ecografia	1 - Coelho	11	24
PAAF		1	5
Ecocardiografia		1	2

ANEXO II – FOTOGRAFIAS DAS SUTURAS EM T1 E T2



Fotografia de uma das suturas do estudo em T1 (2 dias após a cirurgia)



Fotografia de uma das suturas do estudo em T2 (8 dias após a cirurgia)